



Perspektywy biokatalizy

Marianna Turkiewicz

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Perspectives of biocatalysis

Summary

The report presents the most perspective directions of recent studies within the area of applied biocatalysis that are aimed at widening of the scope of its applications in diverse fields, from the industrial chemical synthesis to health and environment protection. Both known types of natural biocatalysts and the artificial catalytic molecules derived from them have been described. Current advances in the investigations into extremophilic organisms and their unusual enzymes have been also shown. The highest attention has been focused on some sophisticated methods of the improvement of natural catalytic proteins, particularly on their directed molecular *in vitro* evolution. The latest methods of enzyme immobilization and reaction medium engineering that significantly increased the number of their practical applications have been also reported.

Key words:

applied biocatalysis, natural and artificial biocatalysts, extremozymes, directed evolution of enzymes *in vitro*, CLECs, CLEAs, ionic liquids.

1. Wstęp

Ogólnobiologiczne i aplikacyjne znaczenie badań w obszarze biokatalizy, początki których sięgają XIX w., systematycznie rośnie. W opinii Marrsa i in. (1), cytuję: „po fali badań farmaceutycznych i agrobiotechnologicznych, które zdominowały minione piętnastolecie rozwoju biotechnologii, przemysłowa biokataliza

Adres do korespondencji

Marianna Turkiewicz,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź.

biotechnologia

2 (61) 316–336 2003

* Redakcja wyraża wdzięczność Stowarzyszeniu Zbiorowego Zarządzania Prawami Autorskimi Twórców Dzieł Naukowych i Technicznych KOPIPOL za pomoc finansową przy opracowywaniu raportów.

jest postrzegana jako trzecia fala biotechnologii”, co potwierdzają m.in. analizy ekonomiczne OECD (2). Jej sercem – jak to określili cytowani autorzy – jest biokatalizator.

Biokatalizator, rozumiany jeszcze najczęściej jako natywne lub modyfikowane specyficzne białko enzymatyczne, bądź też indywidualna komórka o określonych preferencjach metabolicznych, jest już właściwie z definicji podstawowym narzędziem w każdym procesie biotechnologicznym, bowiem istotą każdego takiego procesu jest biotransformacja, mniej lub bardziej złożona, ale zawsze katalizowana. Oparte są na niej zarówno biotechnologie tradycyjne (wytwarzanie wina, piwa, serów, fermentowanych napojów i sosów, chleba, kiszonek warzywnych, rozmaitych regionalnych produktów spożywczych, itp.), wykorzystywane przez człowieka od tysiącleci, jak też rozwinięte w ostatnim półwieczu nowoczesne biosyntezy i biotransformacje (produkcja antybiotyków, rekombinowanej insuliny, interferonu, hormonów, czynników krzepnięcia krwi i innych biofarmaceutyków, wirusowych szczepionek), oparte na odkryciach biologii molekularnej i opracowanych w ich efekcie technikach inżynierii genetycznej, komórkowej oraz białkowej. Niestety, ogromny potencjał użytkowy biokatalizatorów stanowi ciągle jeszcze tylko wyzwanie dla stereospecyficznej przemysłowej syntezy organicznej, która wykorzystuje go w niewielkim stopniu, także i dlatego, że dotąd dostępne, w większości delikatne naturalne białka katalityczne nie zawsze spełniają, np. pod względem stabilności, wymogi tego przemysłu. W badaniach ostatnich dziesięcioleci udowodniono jednak, że cząsteczka biokatalizatora może zostać indywidualnie dostosowana, wręcz „przykrojona na miarę” do jednostkowych aplikacji, nawet całkowicie odmiennych od znanych nam procesów zachodzących *in vivo*, bądź też wymagających warunków niespotykanych w naturalnym dla danego biokatalizatora środowisku.

Dostosowanie biokatalitycznej cząsteczki do konkretnego procesu, często decydujące o jego opłacalności, można osiągnąć różnymi sposobami:

- Poszukując nowych, przystosowanych do niezwykle trudnych warunków naturalnych biokatalizatorów, wytwarzanych przez ustroje pochodzące z ekstremalnych – oczywiście z ludzkiego punktu widzenia – środowisk, których na naszej planecie nie brakuje, a których bardziej systematyczna eksploracja rozpoczęła się stosunkowo niedawno.

- Wprowadzając zmiany w strukturze molekularnej biokatalizatora, np. poprzez punktowe mutacje lub modyfikacje chemiczne, ale przede wszystkim za pomocą ukierunkowanej molekularnej ewolucji *in vitro*.

- Opracowując stosowną dla danego procesu postać biokatalizatora, którą mogą być nie tylko jego indywidualne cząsteczki bądź całe komórki, ale także ich immobilizowane w różnych matrycach preparaty, a nawet usieciowane w wyniku dehydratacji kryształy lub agregaty biokatalizatorów (tzw. CLECs i CLEAs, patrz rozdz. 5).

- Inżynierując warunki fizyczne procesu (biokataliza pod zwiększonym ciśnieniem), lub częściej – środowisko katalizowanej reakcji, którym może być nie tylko woda, ale i środowiska dwufazowe i niewodne, np. stosowane już od dość dawna

rozpuszczalniki organiczne, ciecze nadkrytyczne, faza gazowa, a ostatnio także ciecze jonowe i rozpuszczalniki nadfluoranowe.

Najistotniejsze z wymienionych zagadnień zostaną szerzej omówione w kolejnych rozdziałach tego opracowania, celowo pomijającego równie ważne dla opłacalności przemysłowej biokatalizy problemy typowo inżynierskie, wyczerpująco zaprezentowane w jednym z poprzednich numerów „Biotechnologii” (59,2002).

Głównym celem jaki postawiła sobie autorka przygotowując raport, było uzmysłowienie Czytelnikowi jak duże jest obecnie na świecie tempo i postęp badań w zakresie biokatalizy. Aby ocenić jaki jest rzeczywisty stan takich badań w polskich ośrodkach naukowych, należałoby dokonać odrębnej analizy, opartej przede wszystkim na skrupulatnym przeglądzie publikowanych przez polskich autorów oryginalnych prac z tego obszaru.

2. Katalityczne biocząsteczki – nie tylko enzymy

Co rozumiemy pod pojęciem biokatalizatora? Jeszcze przed dwudziestoma laty nasza odpowiedź na to pytanie byłaby natychmiastowa i oczywista: „wszystkie dotąd poznane biokatalizatory to **białka enzymatyczne**”. Dzisiaj wiemy, że choć stanowią one rzeczywiście najobszerniejszą klasę naturalnych substancji katalitycznych, nie jest to jedyny rodzaj biokatalizatorów występujących w przyrodzie. Katalitycznymi właściwościami charakteryzują się również niektóre domeny natywnych cząsteczek RNA, po raz pierwszy opisane w początkach lat 80. w zespołach Cecha (3) i Altmana (4), nazwane **rybozymami** lub **RNAzymami**. Tę grupę katalitycznych biocząsteczek wyczerpująco scharakteryzowano w pracach publikowanych w tym samym numerze „Biotechnologii”, do nich zatem odsyłam zainteresowanych Czytelników.

Kolejnym znacząco rozszerzającym zasięg biokatalizy odkryciem było znalezienie katalitycznych DNA w kombinatorycznych bibliotekach jego jednoniciowych cząsteczek, otrzymanych na drodze syntezy chemicznej i wyselekcjonowanych z wykorzystaniem tzw. metody *Selex*; obszerny przegląd tych zagadnień znajdzie Czytelnik w pracy B. Nawrot (5). Analogicznie do katalitycznych RNA, katalityczne DNA określa się mianem **deoksyrybozymów** lub **DNAzymów**. W przeciwieństwie do rybozymów, do tej pory nie znaleziono naturalnych katalitycznych DNA, choć nie można wykluczyć ich istnienia.

W początkach lat 80. ukazały się pierwsze prace (6,7) o **abzymach**, czyli katalitycznych przeciwciałach wytwarzanych laboratoryjnie (tym zagadnieniom była poświęcona obszerna praca przeglądowa S. Bieleckiego, opublikowana w numerze 11 „Biotechnologii” w 1991 r.). Przeciwciała zostały wybrane nieprzypadkowo przez eksperymentatorów dążących do konstrukcji nowej klasy katalitycznych biocząsteczek, bowiem naturalną właściwością każdego z tych białek, powstających w ustroju w odpowiedzi na obecność swoistego immunogenu, jest tworzenie z nim molekularnego kompleksu, którego formowanie jest również nieodłączną cechą katalizy

enzymatycznej. Założono, że jeśli do immunizacji zwierząt doświadczalnych wykorzystana zostanie odpowiednio stabilny analog stanu tranzykcji jakiegoś substratu, którego tworzenie towarzyszy każdej reakcji, otrzyma się w wyniku swoiste przeciwciało, wykazujące wysokie powinowactwo nie tylko do tego analogu, ale i do stanu tranzykcji właściwego substratu. Innymi słowy, takie przeciwciało będzie potrafiło katalizować oczekiwaną przez eksperymentatora chemiczną przemianę danej substancji*.

Do chwili obecnej opracowano procedury otrzymywania abzymów katalizujących ok. 100 różnych reakcji (7), przede wszystkim hydrolizy, ale też kondensacji Diels-Adlera i innych typów przemian, jednakże żadnego z nich nie wprowadzono do produkcji na większą skalę, ponieważ wykorzystuje się w niej przeciwciała monoklonalne, co znacznie zwiększa koszty przedsięwzięcia.

Autorzy technologii otrzymywania abzymów z pewnością nie przypuszczali, że katalityczne przeciwciała zostaną znalezione w naturze. Stwierdzono to już po upływie kilku lat od ukazania się pierwszych prac o abzymach otrzymywanych w laboratoriach naukowych. Początkowo sądzono, że naturalne przeciwciała katalityczne pojawiają się w surowicy krwi tylko w stanach chorobowych, głównie u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi (astma, reumatoidalna artroza), wirusowymi (HIV) i nowotworowymi (8,9), ostatnio jednak pojawiły się doniesienia o bezspornej obecności w mleku zdrowych karmiących kobiet przeciwciał o aktywności kinazy białkowej, rybonukleazy, deoksyrybonukleazy i α -amylazy (10). Ta ostatnia różni się wyraźnie od α -amylazy ludzkiej śliny i trzustki, które potrafią hydrolizować jeszcze maltotriozę, podczas gdy abzym mleka nie rozkłada tego substratu, preferując jako substraty skrobię i wyższe maltooligosacharydy.

Abstrahując od fizjologicznej roli tych naturalnych katalitycznych przeciwciał, ich istnienie potwierdza coraz powszechniejszą opinię enzymologów, że paleta naturalnych biokatalizatorów jest znacznie bogatsza niż mogłoby się wydawać jeszcze kilkadziesiąt lat temu.

Kolejną, niezwykle intrygującą obserwacją, zwłaszcza w świetle poglądów niektórych badaczy sprzed kilkunastu lat, głoszących, że cząsteczki białek enzymatycznych są zaskakująco małe (masa większości enzymów monomerycznych waha się od kilkunastu do stukilkudziesięciu kDa), wzięwszy pod uwagę molekularną złożoność katalizowanych przez nie reakcji, jeśli rozpatruje się je na poziomie atomowym, było wykrycie tzw. **mikrozymów** – nowej klasy naturalnych, katalitycznych biocząsteczek, których masy są niższe od 10 kDa.

Dotąd opisane naturalne mikrozymy są albo małymi białkami o masach z zakresu od 4,3 do 9,7 kDa, albo niewielkimi polipeptydami, zbudowanymi z kilkunastu aminokwasów, jak np. cząsteczka mikroesterazy z *Bacillus stearothermophilus*, złożona z 17 aminokwasów (najmniejszy dotąd opisany naturalny mikrozym; 11).

* Sytuacja jest w rzeczywistości bardziej skomplikowana, bowiem w wyniku takiego postępowania można otrzymać abzym o bardzo wysokim powinowactwie do substratu, ale niekoniecznie o dużej sprawności (liczbie obrotów) katalitycznej w reakcji przemiany tego substratu w oczekiwany produkt.

Izolowanie mikrozymów z naturalnych źródeł nie jest łatwe, ponieważ w oczyszczaniu tak małych cząsteczek zawodzą rutynowe metody opracowane dla izolacji typowych enzymów (12). Jest to prawdopodobnie jedna z przyczyn, że poznaliśmy dotąd tylko nieliczne naturalne mikrozymy, choć wielu badaczy spodziewa się, że są one znacznie szerzej rozpowszechnione w przyrodzie, zwłaszcza w mikroorganizmach termofilnych i w grzybach (13).

Do tej pory opisano mikroesterazę o masie 5,7 kDa z *Candida lipolytica* (14); reninopodobną proteazę z termofilnego szczepu *Actinomyces*, zbudowaną z 79 aminokwasów (15); mikrozym o masie 6,2 kDa z archebakterii *Sulfolobus sulfataricus*, katalizujący tworzenie mostków disiarczkowych w białkach (16); alkalofilną ($\text{pH}_{\text{opt}} = 11$) i termostabilną metaloproteinazę Gram (+) bakterii *Kurthia spiroforme*, pochodzącej z jednego z gejzerów w Yellowstone (17); kilka mikroesteraz o masach od 1530 do 4275 Da z termofilnych grzybów (13) oraz wspomnianą już esterazę z *B. stearothermophilus* o masie 1543 Da i stosunkowo wysokiej aktywności względem tributyriny ($15,6 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ homogennego białka; 11). Niestety, tylko dla dwóch mikrozymów ustalono skład aminokwasowy, nie jest natomiast znana sekwencja i trójwymiarowa struktura żadnego z nich. Pewne właściwości tych biocząsteczek, jak podatność na denaturację, krzywe $v = f[S]$ z charakterystycznym efektem wysycenia, dzwonowaty charakter krzywych $v = f[\text{pH}]$, wskazują na ich enzymopodobny charakter, jednakże badania tej klasy naturalnych biokatalizatorów są ciągle w stanie początkowym i wymagają znacznej intensyfikacji.

Chociaż w świetle dotychczasowych rezultatów badań nad mikrozymami miniaturyzacja rozmiarów katalitycznych białek nie prowadzi do jakichś szczególnych korzyści, np. do zwiększonej stabilności molekularnej i katalitycznej, odkrycie mikrozymów jako kolejnej klasy naturalnych biokatalizatorów otwiera szerokie perspektywy do produkcji przez człowieka na drodze syntezy chemicznej małych katalitycznych białek o zaplanowanych właściwościach. Metodologicznie jest to możliwe, bowiem wydajna chemiczna synteza w fazie stałej łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z kilkudziesięciu nawet reszt aminokwasowych o określonej sekwencji nie nastręcza obecnie specjalnych trudności. Takie syntetyczne mikrozymy mogłyby stanowić dobrą alternatywę dla syntetycznych rybo-, deoksy- i abzymów, których produkcja jest znacznie bardziej kosztowna i skomplikowana, choćby z tego względu, że obejmuje etapy, które trzeba prowadzić *in vivo*.

Badania w tym kierunku są rozwijane w ostatniej dekadzie bardzo intensywnie. Dla przykładu, w 1993 r. opublikowano w „Nature” (18) pracę o syntezie racjonalnie zaprojektowanego 14-aminokwasowego, cyklicznego peptydu, agregującego do formy amfipatycznej helisy, któremu autorzy nadali nazwę Oxaldic1 i który katalizował dekarboksylację szczawiooctanu. Zsyntetyzowano też 42-aminokwasowy peptyd KO-42 z sześcioma resztami His, zwijający się w motyw helisa-pętla-helisa, dimeryzujący do formy czterohelikalnej, katalizujący hydrolizę i transestryfikację estrów p-nitrofenylu 1000-krotnie aktywniej niż 4-metyloimidazol (19). Prawdopodobnie ten syntetyczny mikrozym funkcjonuje na podstawie ogólnego mechanizmu katalizy

kwasowo-zasadowej, w którym wykorzystywana jest protonacja i deprotonacja reszt histydyny. Po wprowadzeniu do aktywnego miejsca KO-42 reszt Arg i Lys, w kinetyce reakcji z jego udziałem pojawił się charakterystyczny efekt wysycenia i znacząco wzrosła specyficzność.

Oczywiście prace nad projektowaniem *de novo* katalitycznych peptydów i małych białek o określonym przestrzennym sfałdowaniu i specyficznych właściwościach funkcjonalnych nie wyszły jeszcze z powijaków, choć ich liczba wzrasta (zainteresowanych odsyłam do wyczerpującego przeglądu Monti i Riva'y, 12). Aby szybciej osiągnąć komercyjny sukces w tej dziedzinie, należałoby połączyć strategię projektowania mikrozymów na podstawie rosnących w szybkim tempie bazach struktur białkowych (rok rocznie rejestruje się ok. trzech tysięcy nowych) z opracowaniem wydajnych metod selekcji interesujących wariantów, adaptując choćby metody skryningu, stosowane w ukierunkowanej ewolucji enzymów *in vitro* (patrz rozdz. 4). Powinno to zaowocować w ciągu najbliższych kilkunastu lat komercjalizacją technologii produkcji zminiaturyzowanych białek katalitycznych.

3. Ekstremozymy

W gospodarce (przemysł rolno-spożywczy, farmaceutyczny, chemiczny, włókienniczy i inne) są obecnie w przeważającym stopniu wykorzystywane natywne bądź rekombinowane, czasem też już udoskonalone *in vitro*, białka enzymatyczne pochodzenia mikrobiologicznego, które nawet w wielu tradycyjnych technologiach zastąpiły, częściowo lub całkowicie, wcześniej stosowane enzymy zwierzęce i roślinne, jak choćby cielecą podpuszczkę czy słodowe enzymy amylolityczne. Po wtóre, wykorzystuje się jeszcze prawie wyłącznie enzymy pochodzące z mikroorganizmów mezofilnych, dobrze zresztą scharakteryzowane, łatwo dostępne w żądanej skali i stosunkowo niedrogie. Naturalne cechy tych białek, w tym także ograniczona konformacyjna stabilność sprawiają jednak, że mogą być one stosowane jedynie w biokatalizie konwencjonalnej, przebiegającej w umiarkowanych warunkach temperatury, ciśnienia, pH, zasolenia, itp., gdy tymczasem wiele już opracowanych procesów technologicznych zachodziłoby znacznie wydajniej, lub wymagałoby mniejszych nakładów, gdyby prowadzono je w warunkach bardziej drastycznych, a opracowanie innych, w tym szersze wykorzystanie biokatalizy w syntezach organicznych, stałoby się łatwiejsze, gdybyśmy dysponowali bardziej zróżnicowaną gamą białek katalitycznych, w tym także zaadaptowanych do niekonwencjonalnych środowisk.

Takie natywne enzymy w przyrodzie występują, a ich producentami są przede wszystkim drobnoustroje ekstremofilne, których pewne grupy (np. psychrofile) są prawdopodobnie znacznie bardziej liczne od mikroorganizmów bytujących w innych środowiskach (85% powierzchni naszej planety to psychrosfera o temperaturach poniżej 5°C). Warto wspomnieć, że poznaliśmy dotąd ok. 500 tys. różnych gatunków drobnoustrojów (bakterii, grzybów, jednokomórkowych glonów i wirusów),

co stanowi według szacunków mikrobiologów nie więcej niż 1% mikroorganizmów żyjących na Ziemi. Wiadomo też, że większości z tych ustrojów nie potrafimy i prawdopodobnie w najbliższej przyszłości nie będziemy potrafili namnażać w warunkach laboratoryjnych (*unculturable microorganisms*), bądź też ich geny w takich hodowlach nie ulegają ekspresji, co (przynajmniej obecnie) ogranicza możliwość pełnej oceny wartości użytkowej nawet tych szczepów, które ulegają propagacji. Szczęśliwie, po przeszło stuletnim ogniskowaniu się badań mikrobiologicznych na florze mezofilnej, ta sytuacja uległa w ostatnim piętnastoleciu wyraźnej zmianie i obecnie ogromne środki przeznaczają się na badania drobnoustrojów ekstremofilnych. Należą do nich: **termo-** (T_{opt} wzrostu powyżej 45°C , a dla hipertermofili powyżej 85°C) i **psychrofile** (T_{min} 0°C i poniżej; metaboliczną aktywność w próbach lodu antarktycznego obserwowano do -17°C , a w powoli rozmrażanych próbach zmarzliny z syberyjskiej tundry do -20°C); (20), **acido-** (pH środowiska poniżej 2) i **alkalofile** (pH 10 i wyższe), **barofile** (ciśnienie > 1 atm), **halofile** (stężenie NaCl w środowisku 4-5M), a także **metalofile** (adaptacja do wysokich stężeń metali ciężkich), **radiofile** (rosną przy wysokich poziomach radiacji dzięki wydajnemu systemowi naprawy uszkodzeń DNA) i **mikroaerofile** (wymagają stężeń tlenu niższych od 21%, wytwarzają unikatowy system enzymów antyoksydacyjnych). Szczególne zainteresowanie, zwłaszcza astrobiologów, budzi najbardziej chyba unikatowa grupa drobnoustrojów ekstremofilnych, tzw. **eutektofile**, żyjące w eutektycznej fazie macierzy lodowej. Jest to faza wityfikacji (zeszklania), w której woda przemienia się już w lód, ale jej ciekłe cząsteczki (oczywiście wraz z nutrientami), są jeszcze obecne w siateczce lodu. W tzw. lodzie typu VI (jeden z rodzajów lodu występującego na Ziemi; 21), ta część wody, która przeszła już w fazę stałą jest cięższa (!) od tej jej części, która jeszcze pozostaje ciekła, jest to zatem sytuacja odwrotna niż w przypadku lodu typu I, który jest najbardziej rozpowszechniony w środowisku ziemskim i który wszyscy dobrze znamy.

Natywne, katalityczne białka wszystkich tych niezwykłych drobnoustrojów, określane w literaturze mianem **ekstremozymów**, wyewoluowały dzięki często długiej i nieprzerwanej presji niesprzyjającego środowiska, są zatem z natury przystosowane do warunków, w których ich mezofilne odpowiedniki tracą swoje funkcje.

Najbardziej zaawansowane są badania enzymów zaadaptowanych do wysokich temperatur ($T_{opt} = 90 \div 115^{\circ}\text{C}$), zwanych często **termozymami** (22), a wytwarzanych głównie przez hipertermofilne archebakterie i eubakterie. Bódcem dla ich rozwoju był komercyjny sukces polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (Taq polimeraza), zastępowanej obecnie przez homologiczny enzym z hipertermofilnego archeona *Pyrococcus furiosus* (23). Skomercjalizowano już także produkcję termofilnych amylaz, ksylanaz i proteaz. Są one wykorzystywane, odpowiednio, w produkcji glukozy i fruktozy ze skrobi, w bieleniu mas papierniczych i w przemyśle piekarniczym, w browarnictwie oraz jako komponenty detergentów piorących nawet w temperaturze wrzenia wody (24). Można się spodziewać, że w najbliższych latach zostaną wprowadzone do praktyki przemysłowej kolejne termozymy, m.in. pullulanaza z *Thermococcus aggre-*

gans, hydrataza nitrylowa z *Bacillus pallidus*, termoacidoofilna esteraza z *B. acidocaldarius*, a także termoalkalostabilne lipazy, np. z *B. thermocatenuatus* (24).

W Polsce badania termozymów są prowadzone w zespołach J. Kura (Katedra Mikrobiologii PG) oraz J. Synowieckiego (Katedra Chemii i Technologii Żywności, PG) i są skupione głównie na hydrolazach glikozydowych *Pyrococcus woesei*.

W ostatniej dekadzie wyraźnie zintensyfikowano też prace nad adaptowanymi do zimna **enzymami psychrofilnymi** (vide – projekt COLDZYME w IV Programie Ramowym UE), poszukiwanymi przede wszystkim u drobnoustrojów antarktycznych oraz u ryb bytujących w zimnych akwenach, rzadziej natomiast w fito- i zooplanktonie z permanentnie zimnych środowisk. Do tej pory rozwiązano rentgenograficznie struktury tylko ośmiu **psychrozymów** – pięciu bakteryjnych i trzech z ryb. Konformację kolejnych kilkunastu ustalono poprzez modelowanie molekularne na podstawie sekwencji ich genów, bowiem krystalizacja wyjątkowo elastycznych molekuł tych adaptowanych do zimna białek jest trudna. Na większą skalę jest obecnie wykorzystywana lipaza *Candida antarctica* oraz prawdopodobnie antarktyczna subtilizyna TA41, a właściwie jej muteina 3G7, otrzymana w wyniku 3 cykli ukierunkowanej ewolucji *in vitro* enzymu dzikiego, w którym wymiana zaledwie 7 aminokwasów (2,3% sekwencji całego natywnego białka) spowodowała istotny wzrost termostabilności (500-krotny w 60°C) i przesunięcie T_{opt} enzymu w kierunku wyższych temperatur (z 45 do 55°C), ale bez utraty wysokiej efektywności katalitycznej w niskich jej przedziałach (25).

Cytowane badania oprócz ogromnego waloru aplikacyjnego (wyewoluowaną subtilizynę można wykorzystać i pewnie już się tak dzieje, bowiem badania współfinansował amerykański koncern Procter&Gamble, w detergentach nadających się do prania zarówno w temperaturze wody wodociągowej, jak i w wyższych, co najmniej do 60°C) mają istotne znaczenie poznawcze. Wykazano w nich bowiem, że termostabilność nie musi być nieodłączną cechą adaptowanego do zimna enzymu, co wydawało się niemal oczywiste w świetle dotychczasowych badań właściwości wielu natywnych psychrozymów (26-29), sugerujących ponadto, że brak termicznej stabilności jest naturalnym wynikiem zwiększonej giętkości molekularnej tych białek, warunkującej ich katalityczną funkcję w środowiskach ubogich energetycznie. Można zatem sądzić, że nie istnieje „przymus termolabilności” zimnych enzymów, wynikający w jakiś oczywisty sposób z praw fizyki i chemii, którym podlegają ich giętkie cząsteczki, jak również, że ta właściwość jest raczej w naturalnie wyewoluowanych psychrozymach cechą przypadkową.

Oprócz psychrofilnych proteaz, duże zainteresowanie biotechnologów budzą też psychrofilne oksydoreduktazy (konstrukcja biosensorów dostosowanych do niskich temperatur, bioremediacja skażonych związkami ropopochodnymi środowisk), lipazy i esterazy, potencjalnie użyteczne w biokatalizie niewodnej (w środowisku rozpuszczalników organicznych spada giętkość molekularna każdego białka, zatem enzym o większej naturalnej giętkości w środowisku wodnym, ma większe szanse na wydajną katalizę w środowisku organicznym), a także glikozydazy (np.

β -galaktozydaza), przydatne w niskotemperaturowych reakcjach hydrolizy (np. laktozy w mleku i w ściekach o dużej zawartości serwatki), i co istotniejsze, także w syntezie *in vitro* licznych sacharydów, np. o właściwościach prebiotycznych.

Badania adaptowanych do zimna enzymów antarktycznych prowadzi się też w Polsce: w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków (A. Płucienniczak), w Zakładzie Genetyki UW (P. Węgleński i P. Stępień), w Zakładzie Biologii Antarktyki PAN (M. Zdanowski) oraz w zespole autorki raportu (Instytut Biochemii Technicznej PŁ). Wszystkie te zespoły posiadają własne kolekcje drobnoustrojów antarktycznych, których zaczątkiem była Kolekcja Zakładu Biologii Antarktyki PAN, utworzona przez S. Rakusa-Suszczewskiego, S. Donachie i M. Zdanowskiego.

Enzymy pozostałych grup mikroorganizmów ekstremofilnych są poznane znacznie słabiej, także z racji istotnych trudności technicznych związanych z hodowlą wielu tych ustrojów. Uważa się jednak, że niektóre z nich (również całe komórki drobnoustrojów) będą wykorzystywane w produkcji biopolimerów o dużym znaczeniu użytkowym (np. kwasu β -hydroksymasłowego i poli- γ -glutaminowego), a także w bioremediacji skażonych – w tych substancjami radioaktywnymi (np. zinyńerowane bakterie *Deinococcus radiodurans*) – środowisk (24).

Szczególnie intrygujący obiekt badań stanowią enzymy wspomnianych już eutektofili, postrzeganych jednak przede wszystkim jako odpowiedniki potencjalnych prymitywnych drobnoustrojów pozaziemskich (20). Według Bakera (30) na powierzchni Marsa panują podobne warunki jak w wiecznej zmarzlinie tundry syberyjskiej, a warunki w podlodowych jeziorach antarktycznych powinny przypominać warunki panujące na powierzchni Europy i Calisto – księżyców Jowisza. Nie wydaje się, aby badania katalitycznych białek tych „lodowych” mikroorganizmów przy użyciu klasycznych metod mogły osiągnąć w bliskiej perspektywie jakiś znaczący postęp, ponieważ po pierwsze ich biosynteza musiałaby przebiegać w warunkach zapewniających stabilny stan wityfikacji wody w podłożu hodowlanym, co może nawet dałoby się osiągnąć, po wtóre natomiast nie wiemy, jak należałoby te białka izolować, oczyszczać, a także choćby jak skomponować środowisko do oznaczenia ich aktywności, aby odpowiadała aktywności przejawianej w warunkach rodzimych. Dlatego nadzieje na rozwiązanie zagadek enzymów, wytwarzanych przez szczególnie kapryśne bądź nie dające się hodować szczepy ekstremofilne, mogą dać bezpośrednie badania całości materiału genetycznego obecnego w próbach gleby, wody, lodu, itd., pochodzących z siedlisk, w których te ustroje naturalnie bytują, czyli badania tzw. **metagenomu**, a inaczej „środowiskowego DNA” (*environmental DNA*) (31,32). Sprowadzają się one do ekstrakcji całkowitego DNA z prób pochodzących z takich siedlisk, totalnego zsekwencjonowania otrzymanych po jego sklonowaniu bibliotek DNA i poszukiwania w nich genów już znanych, bądź też unikatowych enzymów i innych bioaktywności. Pierwsze takie prace, co prawda na razie z materiałem pochodzącym z gleby i osadów dennych ze stosunkowo umiarkowanych środowisk (Morze Czerwone), już się pojawiły (31-33). Grupa Lorenza (31,32) w skriningu metagenomowej biblioteki DNA, zawierającej 80 Gpz w plazmidach, fosmidach,

kosmidach i wektorach λ , znalazła ponad 100 różnych klonów z aktywnością lipaz/esteraz, proteaz i oksydaz, znacznie poszerzając dotychczasową przestrzeń sekwencyjną każdej z grup tych enzymów. Wykryto także unikatowe sekwencje o nieznanej funkcji, które wzbogacają od strony ekologicznej dotychczasowe zasoby zdeponowane w bankach sekwencji genowych. Oczywiście, postęp badań nad unikatowymi i nowymi biokatalizatorami jest przy takim podejściu ściśle uzależniony od równoległych postępów genomiki, a zwłaszcza proteomiki, jednak już dziś można powiedzieć, że rozpoczęła się nowa era badań nad bioróżnorodnością ziemskich organizmów i wytwarzanych przez nie biocząsteczek. Zważywszy, że według wszelkiego prawdopodobieństwa żyjące w całkowitej separacji od co najmniej 500 tys. lat (a nie wykluczone, że od kilku milionów) organizmy zasiedlające np. system jezior Wostok, leżący na głębokości ok. 3000 m pod lądolodem antarktycznym, zostaną już wkrótce poddane takim metagenomowym badaniom, możemy oczekiwać licznych naukowych rewelacji, przede wszystkim dotyczących dróg naturalnej ewolucji katalitycznych białek. Niewykluczone, że znajdziemy także nowe, nie znane dotąd biokatalizatory i inne bioaktywne molekuly.

4. Ukierunkowana ewolucja (*directed evolution*, DE) enzymów *in vitro*

Ukierunkowana ewolucja (*directed evolution*, DE) enzymów *in vitro*, zwana też ewolucją molekularną, powstała w reakcji na niespodziewanie skromne sukcesy inżynierii białkowej (por. artykuł A. Brzozowskiego „Biotechnologia” nr 11, 1991) w udoskonalaniu natywnych enzymów. Stało się jasne, że przy naszej ciągle jeszcze bardzo ograniczonej wiedzy o relacjach struktura/funkcja i mechanizmach działania większości enzymów, ta metoda nie nadaje się do szybkiego i niezawodnego otrzymywania tak ulepszonych wariantów białek katalitycznych, żeby spełniały określone wymogi konkretnego procesu, zwłaszcza przemysłowego.

Ukierunkowana ewolucja enzymów *in vitro*, którą Frances Arnold z Kalifornijskiego Instytutu Technologii, twórczyni tej metody, obrazowo określa jako swojego rodzaju „wylęgarnię” (*breeding*) ulepszonych enzymów (34), odwzorowuje darwinowski proces naturalnej ewolucji. Podobnie jak on opiera się na wykreowaniu na tyle dużej liczby zróżnicowanych wariantów wyjściowego białka katalitycznego, aby było prawdopodobne znalezienie wśród nich docelowego ulepszanego enzymu. W przypadku zatem DE enzymów *in vitro* tworzy się najpierw bibliotekę wariantów genu enzymu, których pula powinna obejmować od 10^6 - 10^8 (małe prawdopodobieństwo sukcesu, tj. znalezienia choćby jednego docelowego, ulepszanego białka) do najlepiej 10^{10} - 10^{12} wariantów (duże prawdopodobieństwo sukcesu).

W naturze takimi bibliotekami zmutowanych genów są populacje osobników danego gatunku, których DNA podlega różnym punktowym mutacjom, a dodatkowe nowe kombinacje sekwencyjne tworzą się podczas rekombinacji już zmutowanego DNA rodziców. O wyborze najlepszego wariantu, czyli po prostu najlepiej

przystosowanego do danych warunków zewnętrznego środowiska osobnika, decyduje taka, a nie inna presja selekcyjna tego środowiska i tylko ten osobnik może przeżyć i przekazać ulepszoną cechę swemu potomstwu, czyli ją utrwalić w kolejnych pokoleniach. Ponadto w naturalnej ewolucji zmutowany gen w sposób automatyczny ulega ekspresji w komórkach swego nosiciela, której wynikiem jest synteza zmienionego białka, rozpoznawanego przez określony czynnik selekcyjny obecny w środowisku.

W ewolucji *in vitro* nie wystarcza zatem utworzenie odpowiednio zróżnicowanej biblioteki wariantów danego genu, ale trzeba jeszcze sprawić, aby każdy wariant mógł oddzielnie ulec ekspresji i aby powstające w jej wyniku zmienione białko enzymatyczne pozostało związane z kodującą je sekwencją (fizyczne związanie genotypu z fenotypem). Ten kompleks powinien pozostać stabilny podczas selekcji wariantów, prowadzonej w kolejnym etapie danej rundy DE na podstawie poszukiwanej cechy docelowego białka enzymatycznego.

DE enzymów *in vitro* już po pierwszych eksperymentach okazała się niezwykle efektywnym sposobem ich ulepszania. Rezultatem było opracowanie licznych metod, technicznie ułatwiających ten proces.

4.1. DE – tworzenie biblioteki genów enzymu

W tworzeniu sekwencyjnej różnorodności wyjściowego genu lub rodziny spokrewnionych genów (rzadziej odległych ewolucyjnie) wykorzystuje się dwa typy metod: **nierekombinacyjne** i **rekombinacyjne**, najczęściej zresztą kolejno w tym samym eksperymencie ewolucyjnym. Wśród tych pierwszych najczęściej stosuje się ep-PCR (*error-prone* PCR), czyli reakcję łańcuchową polimerazy wprowadzającą podczas amplifikacji genu dużą liczbę błędów sekwencyjnych. Znacznie gorsze wyniki dają mutacje chemiczne wyjściowego DNA, bądź techniki przejęte z inżynierii białkowej (ukierunkowane punktowe mutacje, mutacje poprzez nasycenie punktowe), lepszy jest już pasaż genu przez mutatorowe szczepy *E. coli*. Rzadko kiedy jednak można tą drogą uzyskać dostatecznie zdywersyfikowaną bibliotekę wyjściowego genu i dopiero rekombinacja *in vitro* uzyskanych nierekombinacyjnie wariantów DNA może dać bibliotekę o rozmiarach rokujących znalezienie docelowego enzymu.

Z metod rekombinacyjnych najszerzej wykorzystuje się tzw. „tasowanie genów” (DNA-shuffling lub inaczej „płciowy PCR”), opracowane w 1994 r. przez W. Stemmera (35) jako metoda tworzenia bibliotek aptamerowych kwasów nukleinowych, a do DE enzymów wprowadzone przez F. Arnold. Zespół Arnold opracował dwie kolejne metody: StEP (*staggered extension process*) (36) oraz RACHITT (*random chimeragenesis on transient template*) (37), w innych natomiast laboratoriach stworzono następne (CLERY, ITCHY, SHIPREC, SCRATCHY, RID; ich omówienie znajdzie Czytelnik w pracy 37), jak dotąd znacznie rzadziej wykorzystywane w DE.

4.2. DE – wiązanie genotypu z fenotypem

Dla przeprowadzenia tego etapu można wykorzystać metody *in vivo* lub *in vitro*.

Niewątpliwie najszerzej stosowana jest tzw. ekspozycja na fagu (*phage display*). Jej podstawą jest włączenie każdego wariantu zmutowanego genu enzymu do DNA faga w taki sposób, aby po transformacji fagowym rekombinowanym DNA komórek *E. coli* uzyskać ekspresję każdego wariantu zmutowanego enzymu w postaci białka fuzyjnego z jednym z białek (pIII) płaszczka wirusa. W efekcie wszystkie warianty enzymu znajdują się na powierzchni namnożonych w komórkach *E. coli* cząstek faga. Pozwala to w stosunkowo prosty sposób z populacji zrekombinowanych fagów wyosobnić te, które niosą wariant enzymu o odpowiednio wysokim powinowactwie do właściwie dobranego ligandu (analog stanu tranzycji, inhibitor kompetycyjny), związanego z jakąś matrycą, najczęściej stałym złożem.

Ostatnio Shigara i in. w 2002 r. (38) opracowali analogiczną do ekspozycji na fagu technikę ekspozycji na powierzchni komórki drożdżowej, która jest przydatna w ukierunkowanej ewolucji enzymów glikozylowanych lub też ulegających proteolitycznym potranslacyjnym modyfikacjom, które nie zachodzą w systemie fagowo-bakteryjnym.

Alternatywnymi do ekspozycji na fagu (bądź drożdżach) metodami są ekspozycja na rybosomie, ekspozycja na mRNA i kompartmentalizacja *in vitro*.

Podczas ekspozycji na rybosomie, transkrypcja i translacja zmutowanych genów zachodzi *in vitro* w kompleksach: rybosom-mRNA-białko, które charakteryzują się dostateczną trwałością pozwalającą docelowe białko wydzielić w identyczny sposób jak przy ekspozycji na fagu, a mRNA w nich obecny zamplifikować (39).

W ekspozycji na m-RNA (40) tworzone jest kowalencyjne połączenie białka z kodującą je sekwencją, czyli mRNA jako transkryptem każdego z wariantów genu obecnych w bibliotece. Taki kompleks cechuje się nieporównywalnie większą trwałością od trwałości kompleksu rybosom-mRNA-białko. Dalsze postępowanie jest analogiczne (izolacja kompleksu mRNA-białko przejawiającego powinowactwo do matrycy z określonym ligandem, dająca możliwość amplifikacji mRNA).

W kompartmentalizacji *in vitro*, opracowanej przez Griffithsa i Tawfika (41) wykorzystuje się mikroemulsje wody zawieszony w mineralnym oleju. Rozmiary kropelek wody o średnicy ok. 2,6 μm są zbliżone do rozmiarów komórek bakteryjnych, system symuluje zatem naturalny układ. Każda wodna kropla zawiera pojedynczy wariant genu i wszystkie komponenty, które są konieczne do jego wydajnej ekspresji. Taki układ ma przewagę nad ekspresją zmutowanych genów w komórkach, bowiem faza zewnętrzna (mineralny olej) jest całkowicie inerta i nie zawiera żadnej biochemicznej aktywności, w odróżnieniu od systemu komórkowego. Wiązanie genu z syntetyzowanym białkiem jest stabilne, nie ma dyfuzji genów bądź białek między kropelkami ani też fuzji kropelek. Zakres rozmiarów możliwych do uzyskania kropli jest szeroki (0,1-5 μm), a 1ml emulsji zawiera 10^{10} kropli o średnicy 2,6 μm (w 1 ml kultury bakteryjnej jest średnio 10^8 komórek). Autorzy omówionej metody

są przekonani o jej szczególnej przydatności w DE enzymów *in vitro*, jednakże w chwili obecnej najszerzej jest wykorzystywana metoda ekspozycji na fagu zmutowanych wariantów genów.

4.3. DE – sortowanie biblioteki wariantów zmutowanego genu fizycznie związanego z enzymem jako produktem jego ekspresji

Jest to prawdopodobnie najistotniejszy element procesu ukierunkowanej ewolucji, decydujący o jej sukcesie, zatem dobór odpowiedniej metody przeszukiwania bibliotek ma kolosalne znaczenie. W grę wchodzi dwie:

- **selekcja**, której podstawą jest przeżycie gospodarza (zwykle *E. coli*), zawierającego zmutowany gen i kodowane przezeń białko, wyłącznie dzięki obecności wariantu o poszukiwanej (nowej bądź ulepszonej) funkcji, oraz

- **skringing**, znacznie wydajniejszy i skuteczniejszy, bo przeprowadzany bardziej wyrafinowanymi metodami niż hodowle płytkowe transformowanych szczepów, ponadto zaś pozwalający nie tylko znaleźć, ale także skwantyfikować poszukiwaną cechę.

Selekcja. Warunki muszą być tak dobrane, aby nie przeżyły komórki zawierające dziki typ enzymu lub jego gorsze warianty, a tylko te, które produkują ulepszone białko katalityczne. Selekcję najwygodniej jest stosować, wówczas gdy obecność docelowego wariantu enzymu wiąże się np. ze wzrostem oporności na jakiś antybiotyk lub truciznę, bądź też prowadzi do syntezy jakiejś substancji ograniczającej lub znoszącej auksotrofię dzikiego szczepu wybranego do ekspresji wyewoluowanych genów. Można też w ten sposób poszukiwać wariantów enzymów o zwiększonej termostabilności (25). Test selekcyjny musi zawsze zostać tak zaprojektowany, aby jego wynik nie był rezultatem jakichś innych zmian, a tylko tych, które są związane z obecnością poszukiwanego wariantu enzymu. Niestety, typowa selekcja rzadko kiedy nadaje się do wyszukiwania nienaturalnych cech bądź funkcji w bibliotece wariantów.

Skringing jest metodą znacznie czulszą od selekcji, najczęściej opartą na testach zbliżonych do tradycyjnych oznaczeń białek enzymatycznych *in vitro* metodami spektrofotometrycznymi, fluorymetrycznymi, kolorymetrycznymi, itd., choć zostały już opracowane całkiem nowe podejścia, znacznie zwiększające szybkość przeszukiwania wyewoluowanych wariantów enzymów. Wymienić tu można np. system **QUEST** (*querying for enzymes using the three-hybrid system*), wykorzystujący tworzenie w specjalnych 3-składnikowych kompleksach chimerycznego aktywatora transkrypcji, blokowanego tylko, wówczas gdy w układzie jest obecny ulepszony enzym, transformujący swój specyficzny substrat. Zahamowanie transkrypcji tego kompleksu powoduje zmiany mierzalnych parametrów w układzie skringingowym (np. pH). W innej nowej metodzie skringingu (tzw. **FAS**) wykorzystuje się cytometrię przepływową, mierzącą fluorescencję klonów gramujemnego gospodarza, zawierających poszuki-

wane warianty enzymu. Na ujemnie naładowanej powierzchni każdej takiej komórki dobrze absorbują się substraty znakowane elektrododatnim znacznikiem fluorescencyjnym. Emisja fluorescencji nastąpi tylko wtedy jeśli substrat, który ją tłumi zostanie związany w aktywnym centrum ulepszonego enzymu i ewentualnie przemieniony w produkt reakcji. Poziom fluorescencji określa zatem ilościowo powinowactwo tego białka do substratu oraz jego reaktywność katalityczną, czyli pozwala ocenić ilościowo zmiany K_m i k_{cat} nowej wersji enzymu.

Również skryning układów transkrypcyjno-translacyjnych w kroplach mikroemulsji, jako izolowanych kompartmentach, jest łatwy do przeprowadzenia i może być stosowany do przeszukiwania nawet dużych bibliotek enzymów otrzymanych podczas DE. Czytelników zainteresowanych tą tematyką odsyłam do doskonałych opracowań Olsena i in. (42) oraz Griffithsa i Tawfika (41).

Niezależnie jednak jaka metoda skryningu zostanie wybrana przez eksperymentatora, musi być to skryning wysokoprzepustowy (HTS, *high throughput screening*), bowiem daje on możliwość testowania dużej liczby wariantów – co najmniej 10^5 dziennie (przy takiej szybkości dla przeszukania biblioteki 10^8 wariantów potrzeba jednak aż 3 lat), a najlepiej 10^7 - 10^8 wariantów dziennie. Wymaga to miniaturyzacji i automatyzacji całego procesu wraz z analizą wyników. Do takiego skryningu nadają się świetnie zagęszczone mikroplątki, co wykorzystała np. firma Proteus S.A., opracowując całkowicie zautomatyzowany system HTS o firmowej nazwie „Phenomics®”, wykorzystujący mikroplątki zawierające aż 8100 studzienek. W każdej z nich oznaczenie 1 wariantu odbywa się w objętości 300 pl (43).

4.4. Dotychczasowe osiągnięcia DE enzymów – wybrane przykłady

Wykorzystując technikę ukierunkowanej ewolucji *in vitro* zmieniono już specyficzność wielu enzymów, m.in. peroksydazy cytochromu c, której ulepszony mutant akceptował jako substraty mniejsze cząsteczki, np. gwajakol (44); z β -galaktozydazy *E. coli* wyewoluowano β -glukozydazę (45), a z lipazy *Staphylococcus aureus* – fosfolipazę (46). Za pomocą DE zwiększono termostabilność mezofilnej subtilizyny *B. subtilis* (47) oraz wspomnianej już antarktycznej subtilizyny TA41 (25), a także mezofilnej esterazy (48). Podwyższono też aktywność w niskich temperaturach termofilnej dehydrogenazy 3-izopropylolajblczanu (49). Znalezione unikatowe specyficzności, np. nadano fragmentowi DNA, pochodzącemu z biblioteki genów hipertermofilnego archeona *Pyrococcus furiosus*, aktywność β -laktamazy (50), która nie występowała u szczepu rodzicielskiego.

Istnieje także możliwość inżynierowania za pomocą DE całych szlaków metabolicznych w celu uzyskania rozmaitych związków zapachowych, kwasów organicznych, alkoholi, węglowodanów i specyficznych metabolitów wtórnych. Duże postępy obserwuje się zwłaszcza w optymalizacji szlaków biosyntezy karotenoidów (ich biosynteza przez naturalne szczepy jest trudna i kosztowna) w kierunku wzrostu

wydajności i produkcji nowych, unikatowych związków tego typu (37). Bardzo istotne znaczenie miało podwyższenie poprzez DE wydajności szlaku biosyntezy cis-(1S,2R)-indandiolu, prekursora inhibitora proteazy aspartyłowej wirusa HIV, stosowanego jako lek (CRIXIVAN[®], 51). Dzięki DE uzyskano też możliwość syntezy D-aminokwasów przez bifunkcjonalną N-karbamylazę/D-hydantoinazę (52).

Nadzwyczajne wyniki DE enzymów *in vitro*, stosowanej przecież dopiero od 5 lat, stały się impulsem do rozwoju kolejnej metody ulepszania enzymów. Polega ona na doborze, w oparciu na znajomości powtarzających się w wielu białkach enzymatycznych wspólnych elementów strukturalnych, jednego z nich jako celu procesu ulepszania, dokonywanego następnie technikami DE. Oczywiście docelowy obszar cząsteczki natywnego enzymu musi uczestniczyć albo w wiązaniu substratu albo jego katalitycznej transformacji i ta jego funkcja musi być już dobrze znana. Stosując takie podejście, zmieniono np. natywną syntazę 3-indolo-glicerolu, w której działaniu główną rolę spełnia segment o strukturze (α/β)-beczułki, na izomerazę fosforybozyloantranilanu. Co ciekawe, w wyewoluowanym enzymie utrzymał się, niewiele tylko zmniejszony sekwencyjnie, ten sam fragment struktury naddrugorzędowej wyjściowego białka (53).

Te wyniki wskazują, że jesteśmy w przededniu kolejnego skoku w technologii ulepszania enzymów *in vitro*, który prawdopodobnie znacznie poszerzy zakres wykorzystania biokatalizy w przemysłowej syntezie organicznej, zwłaszcza w syntezie nowych farmaceutyków. Dla koncernów farmaceutycznych liczy się bowiem nie tylko sama oferta ulepszonego pod kątem określonego procesu enzymu, ale i czas, w przeciągu którego można uzyskać żądany wariant biokatalizatora.

Kolejne przykłady udanych aplikacji DE w modyfikacjach enzymów przynosi niemal każdy tydzień. Najwięcej tych prac powstaje w USA, mniej w Japonii, a Europa pozostaje daleko w tyle, choć obserwuje się znaczne wysiłki środowisk naukowych przede wszystkim Włoch, Niemiec i Francji, aby tę sytuację zmienić. Autorce raportu niewiele wiadomo o badaniach w obszarze molekularnej ewolucji enzymów *in vitro* w krajowych laboratoriach; takie prace rozpoczęto niedawno w zespole S. Bieleckiego w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej.

5. Nowe postacie preparatów enzymów

Enzymy w postaci rozpuszczalnej, powszechnie wykorzystywane w praktyce laboratoryjnej, a tylko w ograniczonej skali w innych aplikacjach, np. w przetwórstwie żywności (mikrobiologiczna podpuszczka i lipazy w serowarstwie, ksylanazy w wypieku pieczywa o zwiększonej pulchności, proteazy w zmiękczeniu tkanki mięsnej), rzadko kiedy są w tej formie przydatne dla przemysłowej syntezy chemicznej, w której koszt biokatalizatora stanowi jedną z głównych pozycji ogólnych kosztów procesowych. Można je istotnie obniżyć stosując enzymy immobilizowane, zwykle na stałych nośnikach, charakteryzujące się wysoką stabilnością operacyjną (ważną

zwłaszcza dla procesów ciągłych), jak też możliwością wielokrotnego użycia tej samej porcji katalizatora w kolejnych transzach produkcji. Klasyczne metody unieruchamiania enzymów, rodzaje matryc, zalety i wady preparatów immobilizowanych są dobrze znane biotechnologom nie tylko z prac oryginalnych; jest to już wiedza podręcznikowa. Poruszano też te zagadnienia w wielu pracach publikowanych w naszym czasopiśmie (np. w nrnr 24, 29, 44).

W ostatnich latach pojawiły się liczne prace, świadczące o nowym podejściu do starego problemu. Bardzo obiecującą, nową i co istotne, niezwykle stabilną formą immobilizowanego enzymu jest np. biokatalityczny plastik (*biocatalytic plastic*), do którego enzym jest inkorporowany podczas polimeryzacji winylu. Ta technika pozwala przygotować biokatalizator w formie najbardziej odpowiedniej dla danej aplikacji. Przy polimeryzacji suspensyjnej powstają ziarna o kontrolowanych wymiarach, przydatne do formowania złóż w bioreaktorach. Kształtowanie polimeru (z enzymem) w formie cienkich filmów mogłoby posłużyć w otrzymywaniu biokatalitycznych farb i powłok zabezpieczających różne produkty przed psuciem się. Biokatalityczny plastik o odpowiedniej specyficzności mógłby być też stosowany, jak się wydaje, w syntezie chemicznej oraz diagnostyce, a może nawet w terapii medycznej (54).

Do nowych metod immobilizacji można też zaliczyć zamykanie enzymów w hybrydowych kompozytach organiczno-nieorganicznych, wykorzystywane już w skali przemysłowej (Fluka Chemie) oraz zamykanie enzymu bądź całych komórek w sieci polimeru wraz z cząstkami magnetytu, szczególnie przydatne jako metoda otrzymywania złóż przeznaczonych do reaktorów fluidalnych (55).

Bardzo interesującą metodą jest sieciowanie kryształów enzymów (CLECs, *cross-linked enzyme crystals*) (56), osiągane w wyniku dehydratacji pod wpływem polarnego solwentu. Usieciowana w ten sposób krystaliczna subtilizyna zachowywała nawet do 80 godz. stabilność w acetonitrylu i tetrahydrofuranie przy różnych aktywnościach wody, a jej aktywność katalityczna była znacznie wyższa od aktywności liofilizowanych preparatów natywnego enzymu.

Na drodze koprecypitacji enzymu z różnymi mikrokryształami w warunkach dehydratacji układu przez jakiś solwent, można otrzymać pokryte enzymem większe kryształy o rozmiarach rzędu μm , które w środowisku rozpuszczalników organicznych wykazują nawet 100-krotnie wyższą aktywność niż konwencjonalne liofilizowane preparaty białek enzymatycznych. Autorzy tej metody (57) uważają, że taką formę biokatalizatora (mikrokryształy pokryte enzymem) można by wykorzystać nie tylko w syntezie organicznej, ale także we wspomnianym już wysokoprzepustowym skriningu enzymów (HTS), poddawanych ukierunkowanej ewolucji.

Znacznie mniej kosztowne niż sieciowanie kryształów enzymów (CLECs), jest otrzymywanie usieciowanych agregatów białek enzymatycznych (CLEAs, *cross-linked enzyme aggregates*). W tym przypadku sieciowanie następuje równolegle z precypitacją białka, którą można przeprowadzić w różny sposób, oczywiście w warunkach niedenaturujących. CLEAs lipazy *Candida antarctica* otrzymane w obecności eteru ko-

ronowego wykazywały o 170% wyższą aktywność w hydrolizie p-nitrofenylopropionianu od enzymu natywnego (58), wzrastała też znacznie ich aktywność syntetyczna w rozpuszczalnikach organicznych i w obecności surfaktantów.

6. Inżynierowanie środowiska reakcji; ciecze jonowe

Kierunek i przebieg katalizowanej reakcji zależy nie tylko od wybiórczości działania i właściwości kinetyczno-termodynamicznych białka enzymatycznego wykorzystywanego w procesie, ale także od chemicznego charakteru środowiska reakcji, którym *in vitro* może być nie tylko woda, ale też rozpuszczalniki organiczne, ciecze nadkrytyczne, a także faza gazowa. Badania zachowania się enzymów w tych nienaturalnych środowiskach spowodowały, że klasyczny schemat, wynikający z hipotezy Emila Fishera: jeden enzym-jedna reakcja-jeden substrat, nie może być już traktowany jako pewnik i, że enzymy mogą *in vitro* katalizować transformacje całkowicie odmienne od dokonywanych przez siebie w żywych ustrojach. Tak zatem, lipazy mogą syntetyzować estry i pokrewne związki, proteinazy nie tylko peptydy, ale także estry, glikozydazy – oligo-, a nawet polisacharydy. Te nieoczekiwane uzdolnienia syntetyczne, szczególnie cenne dla produkcji stereospecyficznych substancji, zostały wielokrotnie zaprezentowane także na łamach „Biotechnologii” (choćby w bieżącym jej numerze), dlatego w tym rozdziale zostanie jedynie omówione wykorzystanie cieczy jonowych jako środowiska reakcji enzymatycznych, ponieważ jest to stosunkowo nowe zagadnienie.

Ciecze jonowe są to sole, występujące w temperaturze otoczenia w stanie ciekłym. Innymi słowy są to sole, które nie muszą być w tej temperaturze roztapiane za pomocą zewnętrznego źródła ciepła. Składają się z heterocyklicznych kationów, zawierających organiczny azot oraz z nieorganicznych anionów, są zatem kombinacjami kation/anion.

Właściwości cieczy jonowych są niezwykle – są one ciekłe w szerokim zakresie temperatur (do ok. 300°C), ich punkt topnienia leży w temperaturze pokojowej, rozpuszczają się w nich liczne substancje nieorganiczne i organiczne, a nawet polimery, cechuje je wysoka polarność, znikome ciśnienie par, doskonała i zróżnicowana kwasowość Lewisa/Brönsteda, ponadto można je wielokrotnie używać i poddawać recyklingowi. Reakcje chemiczne w nich prowadzone, także te bez udziału katalizatorów biologicznych, cechują się wyższą specyficznością i wydajnością. Ponadto, w przeciwieństwie do rozpuszczalników organicznych, stosując ciecze jonowe możemy dowolnie kształtować pH środowiska reakcji, co dla katalizy enzymatycznej ma pierwszorzędne znaczenie.

Mechanizm działania cieczy jonowych jest niejasny, jednakże można nimi zastępować nie tylko rozpuszczalniki organiczne, ale i ciekłe kwasy w syntezie chemicznej (59). Właściwości cieczy jonowych zależą od ich składu, a ten można w szerokim zakresie zmieniać, odpowiednio komponując rodzaj i proporcje kationów i anio-

nów, dostosowując końcowy skład cieczy jonowej do danej reakcji, jest to zatem właściwie projektowanie rozpuszczalnika.

Oczywiście w kontekście tego opracowania najbardziej istotna jest możliwość wykorzystania cieczy jonowych w biokatalizie, choć są one bardzo uniwersalne i znalazły już wiele innych aplikacji (elektrolity w procesach elektrochemicznych, substraty do wytwarzania nowych materiałów, rozpuszczalniki do separacji i ekstrakcji licznych substancji).

W biokatalizie ciecze jonowe były już z powodzeniem stosowane (ciągle jeszcze w skali laboratoryjnej) jako środowisko w licznych reakcjach transestryfikacji, alkoholizy i amoniolizy z udziałem lipaz (60), w rozdziale racematów P-chiralnych hydroksymetanofosfinatów i tlenków hydroksymetanofosfinatów (61) katalizowanym przez pleśniowe lipazy, a także w syntezie Z-aspartamu z udziałem termolizyny (cyt. za Kielbasińskim i in.; 61).

Ostatnio (62) ukazała się pionierska praca, w której do redukcji ketonów w środowisku cieczy jonowej zostały wykorzystane immobilizowane drożdże piekarskie, przy czym w tym systemie następowała regeneracja NADPH z szybkością dostosowaną do szybkości głównej reakcji. Jest to pierwsza informacja o udanej biotransformacji w cieczy jonowej z udziałem komórek, dowodząca, że w odpowiednim środowisku reakcji mogą być one użyte w syntezie chemicznej.

Walory cieczy jonowych jako środowiska reakcji podnosi fakt, że superkrytyczny CO₂ (ScCO₂), nieźle się w nich rozpuszcza (np. 60% CO₂ rozpuszcza się w [BMT] [PF₆] przy ciśnieniu 80 bar), co otwiera nowe pole do inżynierowania środowiska reakcji, tym bardziej interesujące, że obydwie rozpuszczalniki są przyjazne dla środowiska. Co prawda takie mieszaniny nie były jeszcze stosowane w katalizie enzymatycznej, ale z powodzeniem wykorzystano je w chemicznych reakcjach hydrogenacji i hydrowinylacji (63).

Na koniec należy wspomnieć o kolejnym rodzaju rozpuszczalnika, który potencjalnie może być użyteczny dla biokatalizy. Są to rozpuszczalniki nadfluoranowe, jednakże aby katalizator w nich się rozpuścił, trzeba zaprojektować specjalne ligandy. Pewne niebezpieczeństwo stanowi fakt, że te rozpuszczalniki rozkładają się w wysokiej temperaturze, dając toksyczne związki i pochodne fluoru, co zawęziłoby zakres temperatur, który mógłby być wykorzystany w biokatalizie zachodzącej w ich środowisku (63).

7. Zakończenie

W raporcie starano się w możliwie skondensowanej formie przedstawić najnowsze tendencje badawcze w obszarze biokatalizy. Nie było to zadanie łatwe, bowiem te tendencje są tak różnorodne, a postęp prac wręcz lawinowy, że nie można być pewnym, już nawet nie tego, czy zostały uwzględnione rzeczywiście wszystkie najistotniejsze nowości, ale czy dobór zaprezentowanych w raporcie był właściwy.

Ocenia się, że w chwili obecnej ponad 60% produktów i ponad 90% procesów przemysłowych opiera się na katalizie, w przeważającym jeszcze stopniu na katalizie chemicznej. Przyszłość jednakże z pewnością należy do biokatalizy. Również chemicy coraz lepiej rozumieją tę konieczność, sięgając coraz częściej w swych badaniach do biomolekuł katalitycznych. W raporcie pominięto prezentację tych przemysłowych procesów, które już są oparte na biokatalizie, jest to bowiem materiał na odrębne opracowanie. Nie ma zresztą takich procesów zbyt wiele, zważywszy na zasięg współczesnego przemysłu syntezy organicznej. Dzieje się tak i z tego względu, że nakłady poniesione w przeszłości na rozwój procesów opartych na katalizie chemicznej były ogromne i koncerny chemiczne pragną dyskontować kolejne zyski z tego tytułu. Jednakże coraz większa świadomość społeczeństw o zagrożeniach jakie stwarza klasyczny przemysł chemiczny dla ziemskiego środowiska, wymusi z pewnością szersze wykorzystanie procesów biokatalitycznych. Likwidują one przecież uciążliwe dla środowiska odpady i nie prowadzą do tworzenia niechcianych substancji ubocznych, czasem trudnych do usunięcia z głównego produktu. Ponadto biokatalizatory charakteryzują się niespotykaną wśród katalizatorów chemicznych selektywnością działania, czyli cechą o wyjątkowym znaczeniu dla syntezy organicznej.

Również inne obszary aplikacji biokatalizatorów (nie tylko oczywiście enzymów, ale także RNAzymów, DNAzymów i abzymów), zwłaszcza w medycynie, są ogromne i niejednokrotnie były rozważane na łamach „Biotechnologii”.

Literatura:

1. Marrs B., Delagrave S., Murphy D., (1999), *Cur. Opin. Microbiol.*, 2, 241-245.
2. Bull A., Marrs B., Kurane R., (1998), *Biotechnology for clean industrial products and processes industrial sustainability*, OECD Publication, Paris.
3. Kruger K., Grabowski P. J., Zang A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., (1982), *Cell*, 31, 147-157.
4. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsch T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
5. Nawrot B., (2002), *Post. Biochem.*, 48, 20-33.
6. Lerner R. A., Tramontano A., (1981), *Sci. Amer.*, 258, 58-60.
7. Lerner R. A., Benkovic S. J., Shultz P. J., (1991), *Science*, 252, 659-667.
8. Kalaga R., James L. L., O'Dell J. R., Paul S., (1995), *J. Immunol.*, 155, 2695-2702.
9. Paul S., Volle D. J., Beach C. M., Jonson D. R., Powell M. J., Massey R. J., (1989), *Science*, 244, 1158-1162.
10. Savelev A. N., Kanyshkova T. G., Kulminskaya A. A., Buneva V. N., Eneyskaya E. V., Filatov M. V., Nevinsky G. A., Neustroev K. N., (2001), *Clin. Chim. Acta*, 314, 141-152.
11. Simoes D. C. M., McNeill D., Kristiansen B., Matthey M., (1997), *FEMS Microbiol Lett.*, 147, 151-156.
12. Monti D., Riva S., (2001), *Biocatal. Biotransform.*, 19, 251-266.
13. Xiaolian F., Matthey M., (1999), *Biotechnol. Lett.*, 21, 1071-1076.
14. Adoga G., Matthey M., (1979), *FEMS Microbiol Lett.*, 6, 61-63.
15. Laxer S., Pinsky A., Bartoov B., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2483-2492.
16. Guagliardi A., Cerchia L., de Rosa M., Rossi M., Bartolucci S., (1992), *FEBS Lett.*, 303, 27-30.
17. Steele B. D., Fiske M. J., Steele B. P., Kelley V. C., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 358-360.

18. Johnsson K., Alleman R. K., Widmer H., Benner S. A., (1993), *Nature*, 365, 530-532.
19. Broo K. S., Nilsson H., Nilsson J., Baltzer L., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 10287-10295.
20. Deming J., (2002), *Cur. Opin. Microbiol.*, 5, 301-309.
21. Sharma A., Scott J. H., Cody G. D., Fogel M. L., Hazen R. M., Hemley R. J., Huntress W. T., (2002), *Science*, 295, 1514-1516.
22. Vieille C., Zeikus J. G., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 183-190.
23. Adams M. W. W., (1993), *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 627-658.
24. Demirjan D. C., Morris-Varas F., Cassidy C. S., (2001), *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 5, 144-151.
25. Miyazaki K., Wintrode P. L., Grayling R. A., Rubingh D. N., Arnold F., (2000), *J. Mol. Biol.*, 297, 1015-1026.
26. Feller G., Gerday Ch., (1997), *Comp. Crystallogr.*, D54, 780-798.
27. Gerday Ch. et al., (2000), *Trends Biotechnol.*, 18, 103-107.
28. Brechley J., (1996), *J. Ind. Microbiol.*, 17, 432-437.
29. Caviccoli R., Siddiqui K. S., Andrews D., Sowers K. R., (2002), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 13, 253-261.
30. Baker V. R., (2001), *Nature*, 412, 228-236.
31. Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., Eck J., (2002), *Int. Symp. Engineering Enzymes for Biocatalysis by Using Directed Evolution*, Pasteur Institute, Paris, September, 2-7, 47.
32. Lorenz P., Liebeton K., Niehaus F., Köler B., Wolf M., Eck J., Zinke H., (2001), *Int. Symp. BioTrans*, Darmstadt, September, 2-7, 93.
33. Poch O., (2001), *Symposium de Section de Microbiologie Industrielle et de Biotechnologie: Les Enzymes – de la Production a l'Evolution Moleculaire*, Paris, l'Institut Pasteur, Avril 4-5 2001, session 1.
34. Anold F., (2001), *Nature*, 409, 253-257.
35. Stemmer W. P., (1994), *Nature*, 370, 389-391.
36. Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J. A., Arnold F., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 258-261.
37. Zhao H., Chockalingam K., Chem. Z., (2002), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 13, 104-110.
38. Shiraga S., Heda M., Takakashi S., Tanaka A., (2002), *J. Mol. Catal B: Enzymatic*, 17, 167-173.
39. Minard P., (2001), *Symposium de Section de Microbiologie Industrielle et Biotechnologie: Les enzymes – de la Production a l'Evolution Moleculaire*, Paris, Institut Pasteur, Avril 4-5, session 5.
40. Szostak J. W., Wilson D. S., (1999), *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 611-617.
41. Griffiths A. D., Tawfik D. S., (2000), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 11, 338-337.
42. Olsen M., Iverson B., Georgion G., (2000), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 11, 331-337.
43. Lefevre P., (2002), *Int. Symp. Engineering Enzymes for Biocatalysis by Using Directed Evolution*, Pasteur Institute, Paris, September 16-18, 21.
44. Iffland A., Gendreizig S., Tafelmeyer P., Johnsson K., (2000), *Biochemistry*, 39, 10790-10798.
45. Stefan A., Radeghieri A., Gonzales-Wara Z. A., Hochkoeppler A., (2001), *FEBS Lett.*, 493, 139-143.
46. Li Q. S., Schwaneberg U., Fischer P., Schmidt R. D., (2000), *Chemistry – Europ. J.*, 6, 1531-1536.
47. Zhao H., Arnold F., (1999), *Protein Eng.*, 12, 47-53.
48. Gershenson A., Schauerte J. A., Giver L., Arnold F., (2000), *Biochemistry*, 39, 4658-4665.
49. Suzuki T., Yasugi M., Arisaka F., Yamagiski A., Oshima T., (2001), *Protein Eng.*, 14, 85-91.
50. Yano T., Kagamiyama H., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 903-907.
51. Zhang N., Stewart B. G., Moore J. C., Greasham R. L., Robinson D. K., Buckland B. C., Lee C., (2000), *Met. Eng.*, 2, 339-348.
52. Kim G. J., Cheon Y. H., Kim H. S., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 211-217.
53. Altamirano M. M., Blackburn J. M., Aguayo C., Ferscht A. R., (2000), *Nature*, 403, 617-622.
54. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Wiltholt B., (2001), *Nature*, 409, 258-268.
55. Antczak T., Szczęśna-Antczak M., Bielecki S., (2001), *Niekonwencjonalne procesy biotechnologiczne, w: Kod: Korzyści, oczekiwania. Dylematy biotechnologii*, (2001), pod red. Twardowski T., Michalska A., Edytor, Poznań, 108-141.
56. Fernandes J. F. A., Halling P. J., (2001), *BioTrans*, Darmstadt, September 2-7, 401, P-284.
57. Kreiner M., O'Farrell N., Parker M. C., Moore B. D., (2001), *ibid.*, 174, P-060.
58. Lopez-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2001), *ibid.*, 132, P-018.

59. Zhao D., Wu M., Kou Y., Min E., (2002), *Catalysis Today*, 74, 157-189.
60. Olivier-Bourbigon H., Magna L., (2002), *J. Mol. Catal. Chemical*, 182, 419-437.
61. Kielbasiński P., Albrycht M., Luczak J., Mikołajczyk M., (2002), *Tetrahedron: Asymmetry*, 13, 735-738.
62. Howarth J., James P., Dai J., (2001), *Tetrahedron Lett.*, 42, 7517-7519.
63. Deng Y., Shi F., Beng J., Qiao K., (2001), *J. Mol. Catal: Chemical*, 165, 33-36.