



Środowisko niewodne – miejsce katalizy enzymatycznej

Renata Bancierz¹, Grażyna Ginalska²

¹Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

²Katedra i Zakład Biochemii, Uniwersytet Medyczny, Lublin

Nonaqueous media – site of enzymatic catalysis

Summary

Lipases, esterases, acylases, glycosidases, aldolases are the most used enzymes in synthetic organic chemistry. Among the biocatalysts, lipases are the most frequently used. This class of enzymes is able to catalyze the hydrolysis of carboxylic acid esters in aqueous medium on the reverse reaction in organic solvents. The use of enzymes in organic solvents is now well established and there are several advantages of conducting enzymatic reaction in water poor media such as increased solubility of hydrophobic substrates, shifting of thermodynamic equilibrium in favour of synthesis over hydrolysis and increased thermostability of the enzyme. However, the practical application of enzyme in organic solvents has been hampered by the low catalytic activities compared to those expressed in water. This review highlights recent research on the stabilization of enzymes using both chemical and biological means to increase the lifetime of the biocatalyst.

Key words:

lipase, organic solvents, stabilization, modification.

1. Wprowadzenie

Aktywacja enzymów w rozpuszczalnikach organicznych jest godnym uwagi osiągnięciem w dziedzinie enzymologii oraz chemii organicznej. Wiele enzymów wykazuje aktywność w różnorodnych rozpuszczalnikach organicznych, a ich wydajność katalityczna w organicznych środowiskach jest porównywalna do tej w wodzie. Z analitycznego punktu widzenia zastąpienie wody rozpuszczalnikiem organicznym zapewnia liczne zalety przeprowadzania enzymatycznych reakcji:

Adres do korespondencji

Renata Bancierz,
Zakład Biochemii,
Uniwersytet Marii
Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin.

biotechnologia

4 (87) 168–182 2009

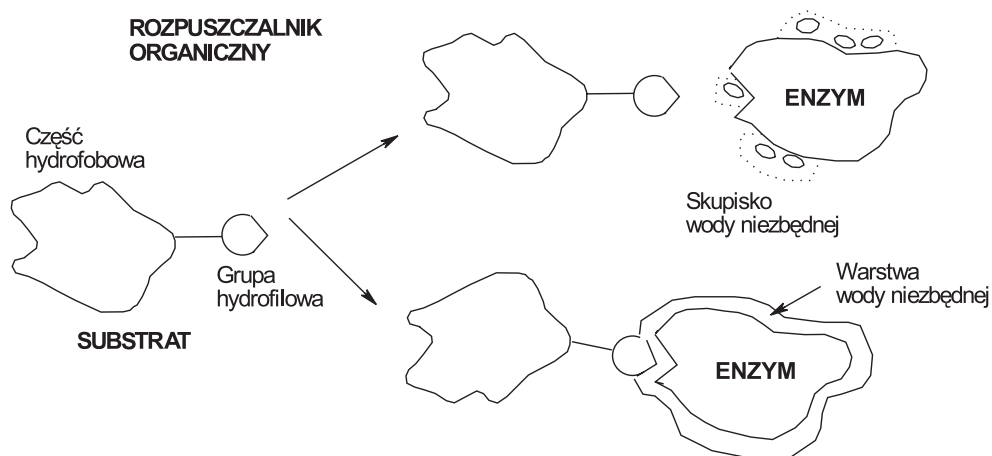
- przesunięcie termodynamicznej równowagi reakcji w kierunku syntezy estrów,
- wzrost rozpuszczalności niepolarnych substratów i produktów,
- większą wydajność reakcji spowodowaną pominięciem długotrwałych procedur w czasie odzysku produktu oraz łatwiejszy odzysk produktów,
- łatwy odzysk enzymu,
- wyeliminowanie wielu zależnych od wody ubocznych reakcji, m.in. hydrolizy czy polimeryzacji,
- eliminację mikrobiologicznych zanieczyszczeń,
- wzrost termostabilności enzymu,
- możliwość zmiany substrato- i enancjoselektywności,
- inhibicja enzymu, wywołana przez lipofilne substraty czy produkty, jest zminimalizowana z powodu ich małego stężenia na powierzchni enzymu (1,2).

Obecnie prowadzone w wielu laboratoriach naukowych badania koncentrują się głównie na wyjaśnieniu struktury i właściwości enzymów w niewodnym środowisku, udoskonalaniu właściwości katalizatorów do stosowania ich w organicznych rozpuszczalnikach, projektowaniu nowych typów reakcji, i w końcu na wdrażaniu tych nowych osiągnięć dla zastosowań syntetycznych.

2. Wpływ wody na katalityczną aktywność enzymu

Całkowicie bezwodny rozpuszczalnik nie jest zdolny do utrzymania aktywności enzymu. Niewielka ilość wody jest zawsze wymagana przez enzym dla zachowania jego natywnej struktury odpowiedzialnej za katalizę. Woda działając jako „nawilżacz” pozwala enzymom na wykonywanie konformacyjnych ruchów wymaganych do optymalnej katalizy. Organiczne rozpuszczalniki nie są do tego przystosowane, ponieważ nie posiadają one, tak jak woda, zdolności do angażowania się w wielokrotne wiązania wodorowe. Mają również małą stałą dielektryczną prowadzącą do silnych elektrostatycznych oddziaływań i powodującą tym samym większą sztywność białek (3). Wskazuje to, że enzymy powinny być mniej aktywne w bezwodnych rozpuszczalnikach aniżeli w wodzie właśnie z powodu ograniczonej ruchliwości konformacyjnej. Jednak obecność mocno związanej monowarstwy wody wokół cząsteczki enzymu przyczynia się do tego, że białka enzymatyczne wykazują znaczną aktywność katalityczną w takich podłożach (4).

Woda występująca w biologicznych systemach podzielona jest na dwie fizycznie różne kategorie. Większość wody (ponad 98%) służy jako „prawdziwy” rozpuszczalnik (tzw. woda całkowita – rozpuszczona w całej niewodnej fazie), podczas gdy mała frakcja jest mocno związana z powierzchnią enzymu (tzw. woda związana). Zaks i Klibanov (4) udowodnili, że aktywność enzymu jest zależna od ilości wody związanej z białkiem, a nie od stężenia wody w rozpuszczalniku organicznym. Stwierdzili również, że woda związana z cząsteczką enzymu mogła nie tworzyć



Rys. Uproszczony schemat katalizy enzymatycznej w rozpuszczalniku organicznym (6).

prawdziwej monowarstwy otaczającej enzym, ale raczej tworzyła kilka skupisk zlokalizowanych prawdopodobnie wokół naładowanych i polarnych regionów na powierzchni enzymu (rys.).

Woda związana z enzymem jest istotniejsza dla struktury i aktywności biokatalizatora aniżeli woda całkowita. Woda zaadsorbowana do cząsteczki enzymu wpływa na mechanizm działania i strukturę białka różnymi sposobami:

- oddziałując na strukturę enzymu poprzez niekowalencyjne wiązania,
- zmieniając strukturę białka przez rozrywanie wiązań wodorowych,
- ułatwiając dyfuzję reagentów,
- wpływając na przesunięcie równowagi reakcji.

Zbyt mała zawartość wody generalnie obniża aktywność enzymu. Z kolei wysoka zawartość wody może również redukować szybkość reakcji poprzez agregację cząsteczek enzymu oraz wywołując ograniczenia dyfuzyjne (7). Optymalna ilość wody istotna dla reakcji katalitycznej często zawiera się w wąskim przedziale. Odpowiedź na decydujące pytanie dotyczące tego, jak duża ilość wody jest konieczna dla utrzymania katalitycznej aktywności, zależy od samego enzymu. Są enzymy, dla działania których wystarczająca jest dużo niższa ilość wody, niż wymagana do utworzenia pojedynczej warstwy wody wokół biokatalizatora, np. α -chymotrypsyna potrzebuje tylko 50 cząsteczek wody przypadających na jedną cząsteczkę enzymu dla zachowania aktywności (5). Inne enzymy, takie jak subtylizyna czy lipaza, są podobne w swoich wymaganiach, co do śladowych ilości wody (4).

Do wskazania ilości wody obecnej w mieszaninie reakcyjnej, Halling (8,9) sugeruje stosowanie terminu „aktywność wody” (a_w) zamiast „zawartość wody”, ponieważ aktywność wody opisuje jej oddziaływanie na równowagę reakcji i dlatego jest lepszą miarą.

Ilość wody wymagana do aktywności biokatalizatora może znacznie różnić się, gdy zmieniają się rozpuszczalniki. Rozpuszczalniki polarne wymagają wyższej zawartości wody, aby uzyskać taką samą dostępność substratu do aktywnej cząsteczki enzymu w porównaniu ze związkami niepolarnymi (10). Aktywność wody wymagana do dobrej sprawności katalitycznej może ulegać zmianie w zależności od źródła pochodzenia enzymu. Na przykład niektóre lipazy zachowują wysoką aktywność nawet po wysuszeniu za pomocą sit molekularnych, np. lipaza z *Rhizomucor miehei* (11) oraz z *Candida antarctica* (12).

Podsumowując, woda odgrywa dwojaką rolę w aktywności enzymów w rozpuszczalnikach organicznych. Z jednej strony jest ona wymagana do ochrony konformacji katalitycznej i funkcjonalności enzymu. Z drugiej jednak, może ona bezpośrednio oddziaływać na specyficzne reakcje, jak np. na estryfikację, w których woda niekorzystnie wpływa na termodynamiczną równowagę reakcji chemicznych (10). Ogólnie stwierdza się, że tylko małe objętości wody są wymagane do pomyślnego stosowania enzymów w rozpuszczalnikach organicznych.

3. Wybór rozpuszczalnika organicznego

Dla wysokiej aktywności lipaz w reakcjach w systemie niewodnym istotny jest dobór rozpuszczalnika z tego powodu, że może on w różny sposób oddziaływać na katalizę enzymatyczną:

1. Rozpuszczalnik może inaktywować enzym poprzez bezpośrednie oddziaływanie z nim. Natywna struktura białka jest utrzymywana poprzez złożone niekowalencyjne oddziaływania, takie jak: wiązania wodorowe i jonowe, van der Waalsa oraz oddziaływania hydrofobowe, a woda jest wymagana do utrzymywania wielu z tych oddziaływań. Natomiast brak wody i obecność rozpuszczalnika organicznego może modyfikować natywną konformację enzymu poprzez wnikanie rozpuszczalnika do hydrofobowego rdzenia białka powodując tym samym rozerwanie zarówno wiązań wodorowych, jak i oddziaływań hydrofobowych oraz redukcję aktywności i stabilności białka enzymatycznego (13). Oddziaływanie to jest szczególnie istotne w przypadku rozpuszczalnych enzymów w systemach bifazowych (woda – nie mieszający się z wodą rozpuszczalnik) oraz w systemach wodnych z niskim stężeniem mieszającego się z wodą rozpuszczalnika organicznego. W specyficznych przypadkach, dla enzymów z wysokim polarnym stanem przejściowym, wnikanie rozpuszczalnika organicznego będzie zmniejszać „lokalną” polarność enzymu w pobliżu jego centrum aktywnego, tym samym destabilizując polarny stan przejściowy (14). Przeciwnie, nierozpuszczalność enzymów w monofazowym rozpuszczalniku organicznym zapobiega dodatkowym zniekształceniom konformacyjnej stabilności katalizatora. Poza tym, stabilizacja enzymu może być też powodowana tzw. „efektem pułapki”: cząsteczki enzymu będą mocno ściśnięte ze wszystkich stron przez otaczające cząsteczki, przypominając immobilizację, która powinna sprzyjać wzrostowi stabilności konformacyjnej (15).

2. Rozpuszczalnik organiczny może oddziaływać na aktywność enzymatyczną poprzez bezpośrednie interakcje z wodą związaną wokół cząsteczki enzymu (16). Chociaż te oddziaływania nie wpływają na sam enzym, to mają one znaczenie dla katalizy. Generalnie, istnieje odwrotna korelacja pomiędzy aktywnością enzymatyczną w rozpuszczalnikach organicznych a hydrofilnością tychże rozpuszczalników – najwyższą aktywność obserwuje się zwykle w rozpuszczalnikach hydrofobowych (4). Wynika to stąd, że hydrofobowe rozpuszczalniki posiadają mniejszą zdolność niż ich hydrofilowe odpowiedniki do odciągania czy zniekształcania istotnej dla cząsteczki enzymu warstwy wody niezbędnej. Hydrofobowe rozpuszczalniki chronią warstwę wody tworzącą pokrywę ochronną enzymu i dzięki temu zachowana zostaje aktywność katalityczna lipaz (17). Istnieją jednak od tej zasady godne uwagi wyjątki, np. subtylizyna oraz lipaza z wieprzowej trzustki funkcjonują jeszcze wtedy, gdy są zawieszane w rozpuszczalnikach mieszających się z wodą (hydrofilowych) (18). Jednym z możliwych wyjaśnień tego zjawiska jest to, że wymienione enzymy są zdolne do utrzymania swojej otoczki hydratacyjnej tak mocno, że nawet hydrofilowe rozpuszczalniki nie potrafią odciągnąć niezbędnej warstwy wody. Takie enzymy są aktywne zarówno w hydrofobowych, jak i w hydrofilowych rozpuszczalnikach.

Parametrem dobrze opisującym rozpuszczalnik i obrazującym istniejącą zależność pomiędzy hydrofobowością rozpuszczalnika a aktywnością lipaz w nim działających jest tzw. współczynnik polarności (hydrofobowości), określane jako $\log P$ (współczynnik podziału rozpuszczalnika pomiędzy oktanołem a wodą) (19). Ogólnie aktywność enzymatyczna lipaz jest niska w polarnych rozpuszczalnikach o $\log P < 2$, średnia w rozpuszczalnikach o $\log P$ pomiędzy 2 i 4 oraz wysoka w apolarnych rozpuszczalnikach o $\log P > 4$ (tab.).

Tabela

Wartość $\log P$ dla niektórych rozpuszczalników organicznych (19)

Rozpuszczalnik	Log P	Rozpuszczalnik	Log P
1	2	3	4
DMSO	-1,30	kwas benzoesowy	1,90
dioksan	-1,10	eter dipropylowy	1,90
metanol	-0,76	chloroform	2,00
acetonitryl	-0,33	heptanol	2,40
etanol	-0,24	toluen	2,50
aceton	-0,23	ksylen	3,10
propanol	0,28	cykloheksan	3,20
tetrahydrofuran	0,49	heksan	3,50
butanol	0,80	dekanol	4,00
cykloheksanon	0,96	heptan	4,00

1	2	3	4
heksanon	1,30	oktan	4,50
fenol	1,50	dodekanol	5,00
cykloheksanol	1,50	tetradekan	7,60
heksanol	1,80	oleinian butynu	9,80

3. Następnym parametrem, który należy uwzględnić przy wyborze rozpuszczalnika jest rozpuszczalność substratów i produktów w środowisku (20) oraz zgodność produktów reakcji z rozpuszczalnikami. Polarne produkty mogą pozostawać w warstwie wody otaczającej enzym i w ten sposób powodować inhibicję katalizatora, czy nawet podlegać niepożądanym reakcjom ubocznym.

4. Właściwości katalizatorów w rozpuszczalnikach organicznych

4.1. Struktura enzymu

Jednym z ważniejszych problemów „niewodnej enzymologii” jest pytanie, jak kontakt z rozpuszczalnikiem organicznym wpływa na strukturę enzymu. Wiedza o konformacji białek w środowisku niewodnym jest podstawowa dla zrozumienia i lepszego wykorzystania enzymatycznej katalizy w takim środowisku. Badania dotyczące wpływu organicznych rozpuszczalników na strukturę enzymu są prowadzone intensywnie od lat. Niestety, rozpuszczalność białek w większości tych związków znacząco ogranicza liczbę badanych rozpuszczalników. Związki organiczne, w których białka rozpuszczają się, a zatem DMSO, DMF, 2-chloroetanol, bezpośrednio oddziałują z białkiem enzymatycznym, powodując znaczące zmiany w ich strukturze (zawartość α -helis i struktur β mocno różni się od zawartości tych struktur w wodnych roztworach) (21). Rozpuszczalniki te mogą łatwo usuwać wodę z powierzchni białka i konkurują o wiązania wodorowe pomiędzy atomami cząsteczki enzymu, co prowadzi do dość dużego rozfałdowania łańcucha białkowego, powodując jego denaturację.

W licznych eksperymentach kinetycznych ujawnia się także, że enzymy w niektórych rozpuszczalnikach organicznych wykazują aktywność porównywalną do aktywności w wodzie (4). To wskazuje, że ich struktura nie różni się znacząco od osiąganą w wodzie. Ważne informacje o zmianach struktury można uzyskać eksperymentalnie, dzięki badaniom krystalograficznym. Kilka lat temu udało się ustalić krystaliczną strukturę usieciowanej subtylizyny w bezwodnym acetonitrylu (22). Porównanie tej struktury z jej odpowiednikiem w wodzie ujawniło, że są one praktycznie identyczne. Takie same wyniki otrzymano dla lekko usieciowanej subtylizyny

w niewodnym dioksanie (23). Krystalografia z wykorzystaniem promieniowania X nie może być niestety stosowana w przypadku enzymów liofilizowanych, zawieszonych w rozpuszczalnikach organicznych. Mimo to, niektóre dane o strukturze takich enzymów mogą być uzyskane dzięki zastosowaniu metody FTIR, czyli absorpcyjnej spektrometrii w podczerwieni z transformacją Fouriera. Użycie tej metody pozwoliło ostatnio na stwierdzenie, że białka (np. liofilizowana subtylizyna) są raczej niewrażliwe na rodzaj organicznych rozpuszczalników, które różnią się znacznie polarnością i naturą chemiczną. Jednakże, katalityczne właściwości enzymu mocno różnią się w obrębie tej samej grupy rozpuszczalników, co sugeruje, że zależność katalitycznej aktywności od rozpuszczalnika może nie być tłumaczona strukturalnymi zmianami w cząsteczce enzymu (24).

Wielu badaczy w prowadzonych przez siebie doświadczeniach starało się dać odpowiedź na pytanie, czy cząsteczka białka enzymatycznego może właściwie fałdować się w rozpuszczalniku niewodnym. Rariy i Klibanov (25) wykazali, że lizozym umieszczony w glicerolu zawierającym ilość wody równą 0,2%, mógł ponownie spontanicznie fałdować się do aktywnej katalitycznie konformacji. To sugerowałoby, że woda nie jest jedynym środowiskiem posiadającym zdolność do utrzymywania oddziaływań molekularnych wymaganych do fałdowania łańcuchów polipeptydowych w konformacje aktywne katalitycznie.

Podsumowując te rozważania można stwierdzić, że to nie kontakt enzymu z rozpuszczalnikiem organicznym, lecz ważniejsze w tym przypadku odwodnienie białka enzymatycznego, powoduje zmiany w jego strukturze i bez wątpienia obniża aktywność katalityczną. Ten niekorzystny efekt można powstrzymać lub przynajmniej zminimalizować, np. poprzez stosowanie do liofilizacji enzymów tzw. lioprotektantów, o czym będzie mowa w dalszej części artykułu.

4.2. „Pamięć pH” enzymów

W wodnych roztworach kataliza enzymatyczna jest mocno zależna od pH i każda reakcja posiada swoje optimum stężenia jonów wodorowych. Jednak w przypadku rozpuszczalników organicznych pojęcie pH nie ma sensu. Z tego powodu, stan uprotonowania enzymu grupami jonowymi musi być kontrolowany przez inne czynniki. Grupa naukowców pod kierunkiem Klibanova (26) dowiodła, że enzymy posiadają tzw. „pamięć pH”. W wodnych roztworach buforowanych jonotwórcze grupy enzymu nabywają odpowiedni i właściwy stan jonizacji, który pozostaje niezmienny w rozpuszczalnikach organicznych. Innymi słowy, katalityczne zachowanie się enzymów w rozpuszczalnikach organicznych odzwierciedla pH ostatniego roztworu, z którego zostały one pozyskane (np. z którego zostały zliofilizowane). Chociaż w ostatnich badaniach liofilizowanych enzymów z zastosowaniem metody FTIR potwierdzono istnienie „pamięci pH”, to jednak istnieją wyjątki od tej koncepcji. Na przykład dehydrogenaza alkoholowa izolowana z końskiej wątroby wykazywała

w heptanie najwyższą aktywność, gdy była liofilizowana z roztworu wodnego o pH 2,0, mimo że w wodzie w tym pH była zupełnie nieaktywna (27).

4.3. Zmiana specyficzności substratowej enzymu

Siłą napędową dla molekularnego rozpoznania substratu oraz katalizy enzymatycznej jest energia wiązania. Międzycząsteczkowe oddziaływania warunkują moc wiązania pomiędzy ligandami a receptorami oraz są odpowiedzialne za wiązanie substratów do enzymów. W biologicznych systemach energia wiązania jest zawsze wyznaczana przez różnice w energii pomiędzy cząsteczkami w roztworze, oddziałującymi z rozpuszczalnikiem a cząsteczkami w kompleksie oddziałującymi między sobą (21). Zatem, jeśli wodne środowisko reakcji zostanie zastąpione przez rozpuszczalnik organiczny, wówczas wolna energia wiązania enzym – substrat zmienia zarówno specyficzność substratową, jak również aktywność katalizatora. Ta zmiana specyficzności enzymu powstaje w wyniku modyfikacji konformacji centrum aktywnego. Eliminacja całej wody z podłoża reakcji prowadzi bowiem do zwiększenia sztywności konformacyjnej (15), a także powoduje niezdolność wiązania substratów przez enzym. Zaks i Klibanov (28) prowadząc badania na wieprzowej lipazie trzustkowej stwierdzili, że „wilgotny” enzym może akceptować szeroki zakres substratów o różnych rozmiarach. Sugeruje to, że szkielet białkowy tejże lipazy jest elastyczny i może przybierać różne konformacje dopasowując się do cząsteczki danego substratu. Jednakże „suchy” enzym nie reaguje ze wszystkimi substratami, prawdopodobnie z powodu większej sztywności centrum aktywnego, które nie jest już zdolne do dopasowania się do różnorodnych substratów.

Zatem również w przypadku zmiany specyficzności substratowej enzymu istotna jest obecność wody w podłożu. Ma ona znaczenie dla hydrofobowych oddziaływań pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów a wiązaniem do samego centrum katalizacyjnego enzymu, a preferencja substratów dla tych enzymów w środowisku organicznym różni się znacząco od tej w wodzie. Najlepiej przebadany enzym, lipaza, w środowisku organicznym, ale z małym stężeniem wody katalizuje różnorodne reakcje, m.in. aminolizę, transestryfikację, estryfikację, wymianę reszt acylowych (29). Natomiast w wodzie, reakcje te są prawie całkowicie tłumione przez procesy hydrolytyczne.

4.4. Termostabilność

W wysokich temperaturach enzymy stają się nieaktywne z powodu częściowego rozfałdowania cząsteczki, jak również zmian kowalencyjnych w I-rzędowej strukturze białka (30). Procesy, które prowadzą do nieodwracalnej inaktywacji enzymów, czyli tworzenia nieprawidłowych struktur, wymiany wiązań disiarczkowych, czy hydrolyzy wiązań peptydowych wymagają obecności wody. Jest zatem oczywiste, że

enzymy powinny być bardziej stabilne w środowisku o małej zawartości wody, takim jak rozpuszczalniki organiczne. Ponadto spadek aktywności wody zmniejsza ruchliwość cząsteczek białek i w rezultacie chroni je przed częściowym rozfałdowaniem, które jest pierwszym krokiem procesu termoinaktywacyjnego (21). Tak zatem, w niewodnych środowiskach termostabilność enzymu rośnie głównie w wyniku wzrostu sztywności białek w tych systemach. Zostało to potwierdzone przez Zaks i Klibanova (28), którzy wykazali, że wieprzowa lipaza trzustkowa umieszczona w bezwodnej mieszaninie trimaślan-heptanol w temperaturze 100°C utrzymuje stabilność przez ponad 12 godzin. Ponadto, w tej temperaturze enzym jest 10 razy bardziej aktywny aniżeli w temperaturze 20°C.

Innym powodem wzrastającej termostabilności enzymów w środowiskach organicznych jest to, że wiele wymagających wody, kowalencyjnych procesów wywołujących odwracalną bądź nieodwracalną inaktywację białek, w niewodnych systemach zachodzi niezwykle wolno. Ueda i wsp. (31) zaobserwowali, że lipaza pochodząca z *Rhodococcus equi* posiada bardzo wysoką aktywność w alkoholowym rozpuszczalniku w temperaturze 70°C tak długo, jak rozpuszczalnik ten pozostaje suchy. W „wilgotnym” podłożu stabilność enzymu jest już bardzo mała. Podnoszenie termostabilności białek enzymatycznych w organicznych podłożach jest również istotne ze względu na fakt, że rozszerza się wówczas zakres temperatury, w których enzymy te są aktywne.

Zatem na stabilność enzymów w niewodnych podłożach mocny wpływ ma ilość wody, jak również i natura samego rozpuszczalnika. Reslow i wsp. (32), a także Zaks i Klibanov (28) zgodnie potwierdzają, że termiczna stabilność enzymu wzrasta wraz z hydrofobowością rozpuszczalników – enzymy umieszczone w bezwodnych hydrofobowych rozpuszczalnikach wykazują najwyższą stabilność. Natomiast termostabilność biokatalizatorów w polarnych związkach jest dość niska.

Z kolei, podczas reakcji syntezy w rozpuszczalnikach organicznych (np. estryfikacji) mogą pojawiać się zakłócenia spowodowane obecnością wody, która jest jednym z produktów reakcji. Gromadzenie wody wpływa na zmianę poziomu równowagi, i w efekcie obniża aktywność enzymu. Ponadto akumulacja wody niekorzystnie oddziałuje na długoterminową stabilność enzymu (33), natomiast redukcja zawartości wody w podłożu reakcji prowadzi zwykle do wzrostu stabilności enzymu.

5. Strategie stabilizacji enzymów

5.1. Modyfikacje środowiska reakcji

Enzymy w systemach niewodnych pozostają aktywne przy założeniu, że istotna i niezbędna monowarstwa wokół cząsteczki enzymu pozostaje nienaruszona. Inżynieria środowiska, w kontekście biokatalizy w środowisku organicznym, będzie dotyczyć przede wszystkim modyfikacji najbliższego sąsiedztwa biokatalizatora. Niepolarne

rozpuszczalniki są lepsze niż polarne, ponieważ zapewniają korzystne środowisko dla działania enzymu. Przy konstruowaniu środowiska reakcji powinny być również brane pod uwagę właściwości substratów i produktów, które będą uczestniczyć w danej reakcji. Szybkość reakcji będzie wysoka, w przypadku gdy środowisko białka enzymatycznego preferuje substraty o dużej rozpuszczalności, a produkty o małej rozpuszczalności. Przy wyborze odpowiedniego rozpuszczalnika bierze się pod uwagę m.in. niską gęstość w celu zminimalizowania ograniczeń w przepływie materii, jego kompatybilność z przeprowadzaną w nim reakcją, toksyczność czy łatwopalność (33).

5.2. Modyfikacje enzymów

Wiadomo, że enzymy w niekonwencjonalnych środowiskach (np. organicznych) wykazują mniejszą aktywność, aniżeli w ich naturalnym środowisku działania. Poszukuje się obecnie metod pozwalających na zwiększenie szybkości reakcji enzymatycznych. Szybkość takich reakcji w środowisku organicznym jest w znacznym stopniu zależna również od sposobu przygotowania enzymu (34,35). Inżynieria katalizatora dotyczy zatem przede wszystkim sterowania aktywnością enzymu poprzez zoptymalizowanie jego preparatyki do zastosowania w reakcjach organicznych.

W niewodnych systemach stosowane są różne formy enzymów:

- enzymy natywne,
- enzymy liofilizowane zawieszone w rozpuszczalnikach organicznych,
- enzymy stałe zaadsorbowane na nośnikach,
- rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych enzymy modyfikowane glikolem polietylenowym (36),
- enzymy pułapkowane w żelu czy w mikroemulsjach (37),
- biokatalizatory immobilizowane.

Brak jest jednak ogólnych wskazówek, co do wyboru najodpowiedniejszej formy enzymu katalizującego specyficzne reakcje. W celu bardziej ekonomicznego i skutecznego stosowania enzymów w wodnych i niewodnych rozpuszczalnikach przeprowadzać można modyfikacje tych enzymów w sposób fizyczny, jak i chemiczny.

5.2.1. Modyfikacja przez immobilizację

Obecnie najczęściej stosowaną modyfikacją biokatalizatorów w odniesieniu do lipaz, jest immobilizacja, czyli kowalencyjne bądź niekowalencyjne przyłączenie enzymów do stałych lub rozpuszczalnych nośników (38). Niektóre z szeroko stosowanych metod immobilizacji to:

- adsorpcja do hydrofobowych lub jonowych nośników (m.in. do szkła, żelu),
- kowalencyjne przyłączenie do odpowiednich aktywowanych chemicznie stałych matryc,

– pułapkowanie lub kapsułkowanie w żelowych polimerach czy mikroemulsjach (39).

Używanie modyfikowanych w ten sposób lipaz jest bardzo korzystne ze względu na poprawę stabilności temperaturowej, immobilizacja jest bowiem procesem, który zapobiega bezpośredniemu kontaktowi enzymu z rozpuszczalnikiem organicznym. Lipaza z *Mucor miehei* immobilizowana na nośniku jonowymiennym jest stabilna nawet w temperaturze 70°C, podczas gdy natywny wolny enzym ulega znacznej deaktywacji już w temperaturze 50°C po 3 godz. (40). Modyfikując fizycznie enzym bez problemu można go również odzyskać w końcowym etapie reakcji oraz wykorzystać ponownie do pracy ciągłej (41). Interesujące jest także to, że immobilizacja lipaz może chronić te enzymy przed inaktywacją przez niektóre produkty reakcji. Dobrze znanym przykładem jest inhibujący wpływ acetaldehydu na lipazy rozpuszczalne. Ten produkt przejściowy tworzony jest podczas reakcji transestryfikacji, w których estry winylowe wykorzystywane są jako donory grup acylowych (42). Immobilizacja może prowadzić również do zmian w specyficzności substratowej. Lipaza z *Pseudomonas cepacia* pokazuje zupełnie odwróconą specyficzność względem substratów po immobilizacji na polipropylenie (43). Enzym wolny preferuje długołańcuchowe estry kwasów tłuszczowych (C14 – C18), podczas gdy biokatalizator immobilizowany wykazuje większe powinowactwo do substratów z krótkimi łańcuchami tłuszczowymi (C2 – C6). Efekt taki może być tłumaczony częściowym oczyszczeniem surowej lipazy podczas procesu immobilizacji oraz ograniczeniami dyfuzyjnymi dla enzymów immobilizowanych.

W procesie unieruchamiania enzymów, stosowanych następnie w reakcjach w środowiskach organicznych, istotny jest dobór właściwej matrycy. Ważne jest, aby nośnik był obojętny i nie wpływał na kinetyczne zachowanie się enzymu. Równie ważne jest, by nośnik nie zmieniał mikrośrodowiska w pobliżu cząsteczki enzymu. Hydrofilowe nośniki (np. alginian wapnia) są kompatybilne z enzymami i mogą być stosowane w celu zwiększenia poziomu uwodnienia enzymu, omijając w ten sposób tworzenie oddzielnej fazy wodnej w podłożu organicznym. Ekstremalnie polarne matryce mogą zaś ograniczać szybkość przepływu hydrofobowych substratów do warstwy enzymu (44). Przy wyborze metody immobilizacji biokatalizatorów znaczenie ma łatwość przeprowadzenia tego procesu. Generalnie adsorpcja jest najłatwiejszą do wykonania techniką, jednak wiązania są często słabe i są atakowane przez rozpuszczalniki organiczne. Biokatalizatorom unieruchamianym w ten sposób brakuje zatem czasami stabilności takiej, jaką uzyskuje się dzięki kowalencyjnemu wiązaniu czy pułapkowaniu (2).

5.2.2. Modyfikacje chemiczne

W chemicznych modyfikacjach lipaz stosuje się różnego rodzaju modyfikatory, które oddziałując ze specyficznymi resztami aminokwasowymi, umożliwiają wyjaśnienie struktury białka i jego centrum aktywnego oraz zmianę i poprawę natywnych właściwości lipaz.

5.2.2.1. Kowalencyjna modyfikacja glikolem polietylenowym oraz innymi polimerami

Do kowalencyjnej modyfikacji lipaz stosowane są hydrofobowe polimery, np. polistyren, jak również amfifiliczne polimery, np. glikol polietylenowy (PEG). Modyfikatory te zapewniają biokatalizatorom wodnopodobne środowisko. Lipazy modyfikowane PEG stają się rozpuszczalne w większości rozpuszczalników organicznych, takich jak benzen, czy chlorowane węglowodany, natomiast nie rozpuszczają się m.in. w n-heksanie (45). W wyniku chemicznych modyfikacji polimerami hydrofobowymi wolne grupy aminowe enzymów, które są aktywne katalitycznie, mogą być częściowo utracone przez te enzymy. Inaczej jednak zachowują się enzymy modyfikowane PEG. W obecności niepolarnych rozpuszczalników organicznych utrzymują one swoją aktywność, ponieważ mocno uwodnione łańcuchy PEG tworzą wokół cząsteczki biokatalizatora wodną otoczkę chroniącą białko przed denaturacją. Jednakże rozpuszczalniki organiczne mieszające się z wodą powodują całkowitą inaktywację enzymów modyfikowanych PEG, poprzez zniszczenie właśnie tej wodnej otoczki (15).

5.2.2.2. Sieciowanie

Do tworzenia nierozpuszczalnych usieciowanych kryształów enzymów (CLEC) stosuje się aldehyd glutarowy. Chociaż chemiczne sieciowanie jest metodą łatwą i niedrogą, to jednak ilość oraz dokładna lokalizacja modyfikacji biokatalizatora nie jest do końca poznana. Trudne do interpretacji jest też to, które zmiany prowadzą do wzrostu stabilności enzymu (2).

5.2.2.3. Opłaszczanie enzymów lipidami i surfaktantami

Opłaszczanie lipaz różnymi surfaktantami, czy lipidami należy do niekonwencjonalnych metod modyfikacji enzymów. Polega ona na tym, że hydrofilowy koniec surfaktanta wiąże się niekowalencyjnie do polarnych (jonowych) grup na powierzchni lipazy, tworząc w ten sposób kompleks enzym-surfaktant, którego powierzchnia jest hydrofobowa z powodu wystającego na zewnątrz hydrofobowego końca modyfikatora (2).

Okahata i Ijiri (46) jako pierwsi opisali preparatykę lipazy powlekaną lipidami. Lipazy z *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas fragi* i *Rhizopus niveus* były powlekanie niejonowymi syntetycznymi dialkylowymi amfilami. Większą szybkość interstryfikacji tripalmitynianu i kwasu stearynowego w n-heksanie zaobserwowano dla lipazy opłaszczonej monostearynianem sorbitanu (Span 60) (47). Span 60 został również zastosowany przez Isono i wsp. (48) do syntezy kompleksu lipaza-surfaktant z enzymu pochodzącego z *Pseudomonas sp.* i biorącego udział w reakcji estryfikacji alkoholo-

lu cetylowego i kwasu palmitynowego w n-heksanie. Na podstawie obserwacji modyfikacji białka lipolitycznego różnymi surfaktantami stwierdzono, że aktywność katalityczna była większa dla enzymów opłaszczonych modyfikatorami posiadającymi odgałęzienia lub podwójne wiązania, w porównaniu do surfaktantów z prostymi łańcuchami pod warunkiem, że liczba węgli w takich związkach była taka sama. Istnieją też doniesienia wskazujące na to, że wpływ surfaktantów na aktywność i stabilność lipaz jest zależny zarówno od pochodzenia lipazy, jak i struktury modyfikatora.

5.2.3. Enzymy w formie stałej – modyfikacje w trakcie liofilizacji

Enzymy często otrzymywane są z odpowiednich wodnych lub buforowanych roztworów w procesie liofilizacji. Udowodniono, że liofilizacja to prosta i skuteczna technika tworzenia form biokatalizatorów, które szczególnie nadają się do katalizy w rozpuszczalnikach organicznych. Składa się ona z trzech etapów: zamrażania, pierwszego oraz drugiego suszenia. Niestety, w każdym etapie procesu liofilizacji może następować inaktywacja enzymów na skutek niepożądanych zmian w II-rzędowej strukturze białek (14). W ten sposób około 40% powierzchni centrum aktywnego może ulec denaturacji.

Aktywność katalityczną enzymu podczas liofilizacji poprawić można kilkoma sposobami:

- dodając małe specyficzne substancje pomocnicze, m.in. węglowodory (49), polimery (50), kwasy tłuszczowe (51). Jednak aktywność enzymatyczną w podłożach organicznych najbardziej podnosi dodatek soli nieorganicznych (52). Monot i wsp. (53) dowiedli ponadto, że aktywujący efekt takich substancji pomocniczych jest wyraźniejszy w „suchych” rozpuszczalnikach aniżeli w rozpuszczalnikach częściowo uwodnionych;

- dodając etery koronowe, np. 18-korona – 6 (54,55);
- dodając lioprotektanty (ligandy), np. sole (56). Nieligandowe lioprotektanty (sorbitol, PEG, cukry, np. trehaloza) są także zdolne do podnoszenia aktywności biokatalizatorów w rozpuszczalnikach organicznych pod warunkiem, że były one obecne w wodnym środowisku przed rozpoczęciem liofilizacji. Liofilizacja enzymów w obecności wymienionych związków zapewnia nadzwyczajny poziom aktywacji biokatalizatorów w porównaniu do enzymów natywnych zawieszonych w rozpuszczalnikach organicznych. Liofilizacja w obecności KCl prowadziła do 3700-krotnego wzrostu aktywności transestryfikacyjnej subtylizyny w heksanie (56). Interesujące jest też to, że aktywność enzymatyczna była mocno zależna od stężenia procentowego KCl użytego do liofilizacji. Tak duży wzrost aktywności był wynikiem przede wszystkim wzrostu obrotów katalitycznych enzymu, a nie tempa wiązania substratu.

5.2.4. „Molekularne wdrukowanie”

Molekularne wdrukowanie polega na tworzeniu kompleksów pomiędzy enzymami a niskocząsteczkowymi ligandami w roztworze, który następnie suszy się i przemycywa odpowiednio dobranymi rozpuszczalnikami usuwającymi te ligandy. Białko indukowane ligandem w bezwodnych podłożach wykazuje drastyczne obniżenie elastyczności, umożliwiając ruchliwość tylko bardzo małym jego łańcuchom i dlatego enzymy zachowują konformację indukowaną ligandami nawet po uwolnieniu liganda z kompleksu. Po raz pierwszy „molekularne wdrukowanie” przeprowadzili Russell i Klibanov (57) dla subtylizyny. Enzym ten został zliofilizowany z roztworu wodnego, w którym obecny był inhibitor kompetycyjny, usunięty w następnym etapie z kompleksu. Powstały w ten sposób biokatalizator wykazywał ok. 100-krotnie wyższą aktywność w porównaniu do enzymu natywnego.

6. Podsumowanie

Wiele enzymów wykazuje aktywność w środowisku niewodnym. Zmiana specyficzności, równowagi chemicznej oraz rozpuszczalności substratów i produktów w rozpuszczalnikach organicznych w porównaniu do środowisk wodnych stwarza możliwości wykorzystania biokatalizatorów do otrzymywania produktów, które nie mogą być wytwarzane w wodzie. Zdolność enzymów do pracy w niewodnych środowiskach oferuje zatem nowe i większe możliwości ich zastosowań w przemyśle.

Literatura

1. Dordick J. S., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 259-267.
2. Hari Krishna S., Karanth N. G., (2002), *Catal. Rev.*, 44, 499-591.
3. Affleck R., Haynes C. A., Clark D. S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5167-5170.
4. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201.
5. Zaks A., Klibanov A. M., (1986), *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2767-2768.
6. Diaz-Garcia M. E., Valencia-González M. J., (1995), *Talanta*, 42, 1763-1773.
7. Hari Krishna S., (2002), *Biotechnol. Adv.*, 20, 239-267.
8. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513-516.
9. Halling P. J., (1987), *Biocatalysis*, 1, 109-115.
10. Muralidhar R. V., Chirumamilla R. R., Marchant R., Ramachandran V. N., Ward O. P., Nigam P., (2002), *World J. Microb. Biotechnol.*, 18, 81-97.
11. Valivety R. H., Halling P. J., Macrae A. R., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 218-222.
12. Orrenius C., Norin T., Hult K., Carrea G., (1995), *Tetrahedron Asymmetry*, 6, 3023-3030.
13. Kuntz I.D., Kauzmann W., (1974), *Adv. Protein Chem.*, 28, 239-345.
14. Serdakowski A. L., Dordick J. S., (2007), *Trends Biotechnol.*, 26, 48-54.
15. Khmelnitsky Y. L., Levashov A. V., Klyachko N. M. L., Martinek K., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 710-724.
16. Gormau L. A. S., Dordick J. S., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 392-397.
17. Yamane T., (1998), *Biocatalysis*, 2, 1-9.

18. Zaks A., Klivanov A. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3192-3196.
19. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-88.
20. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 76-89.
21. Zaks A., (1991), *Biocatalysis for Industry*, Ed. Dordick J. S., 161-180, Plenum Press, New York.
22. Fitzpatrick P. A., Steinmetz A. C. U., Ringe D., Klivanov A. M., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8653-8657.
23. Schmitke J. L., Stern L. J., Klivanov A. M., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4250-4255.
24. Griebanov K., Klivanov A. M., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 351-362.
25. Rariy R. V., Klivanov A. M., (1997), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 13520-13524.
26. Klivanov A. M., (1986), *Chemtech.*, 16, 354-359.
27. Guinn R. M., Skerker P. S., Kavanaugh P., Clark D. S., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 303-308.
28. Zaks A., Klivanov A. M., (1984), *Science*, 224, 1249-1251.
29. Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 367-382.
30. Ahern T. J., Klivanov A. M., (1985), *Science*, 228, 1280-1284.
31. Ueda M., Mukataka S., Sato S., Takahashi T., (1986), *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1533-1537.
32. Reslow M., Adlercreutz P., Mattiasson B., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1-8.
33. Hari Krishna S., Divakar S., Prapulla S. G., Karanth N. G., (2001), *J. Biotechnol.*, 87, 193-201.
34. Paradkar V. M., Dordick J. S., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 529-540.
35. Triantafyllon A. O., Wehtje E., Adlercreutz P., Mattiasson B., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 54, 67-76.
36. Inada Y., Yoshimoto T., Matsushima A., Saito Y., (1986), *Trends Biotechnol.*, 4, 68-73.
37. Bornscheuer U. T., Padmanabhan P., Scheper T., (1999), *Microspheres, microcapsules and liposomes*, Ed. Arshady R., 541-558, Citus Books, London.
38. Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., (2007), *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451-1463.
39. Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J., Haas M. J., (2000), *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 9, 113-148.
40. Gandhi N. N., Patil N. S., Sawant S. B., Joshi J. B., Wangikar P. P., Mukesh D., (1996), *Catal. Rev.*, 42, 439-480.
41. Kilara A., Shahani K. M., (1978), *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 12, 161-198.
42. Weber H. K., Stecher H., Faber K., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 803-808.
43. Pancreach G., Leullier M., Baratti J. C., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 56, 181-189.
44. Tramper J., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 45-50.
45. Inada Y., Nishimura H., Takahashi K., Yoshimoto T., Saha A.R., Saito Y., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 845-850.
46. Okahata Y., Ijiri K., (1995), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 11, 1392-1394.
47. Basheer S., Mogi K., Nakajima M., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 187-195.
48. Isono Y., Nabetani H., Nakajima M., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 887-890.
49. Dabulis K., Klivanov A. M., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 566-571.
50. Otamiri M., Adlercreutz P., Mattiasson B., (1992), *Biocatalysis*, 6, 291-305.
51. Fishman A., Basheer S., Shatzmiller S., Cogan U., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 535-538.
52. Bedell B. A., Mozhaev V. V., Clark D. S., Dordick J. S., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 654-657.
53. Monot F., Paccard E., Borzeix F., Bardin M., Vandecasteele J.-P., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 483-486.
54. Lee M.-Y., Dordick J. S., (2002), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 376-384.
55. van Unen D. J., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 248-255.
56. Iyer P. V., Ananthanarayan L., (2008), *Process Biochem.*, 43, 1019-1032
57. Khmel'nitsky Y. L., Welch S. H., Clark D. S., Dordick J. S., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 2647-2648.
58. Russell A. J., Klivanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 116624-11626.