

HALINA KALINOWSKA, ALICJA BUCHOWIECKA, STANISŁAW BIELECKI

*Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka  
Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź  
E-mail: stanb@p.lodz.pl*

## BIOKATALIZA

### WSTĘP

Biokataliza, to kataliza reakcji chemicznych przez biokatalizatory, takie jak dwie grupy białek globularnych, czyli enzymy i abzymy (katalityczne przeciwciała) oraz pewne kwasy rybonukleinowe (rybozymy) i deoksyrybonukleinowe (deoksyrybozymy). Kwasy nukleinowe i pokrewne do nich związki, najprawdopodobniej odgrywały rolę kluczowych biokatalizatorów podczas najwcześniejszych etapów ewolucji, jednakże zostały zastąpione w jej kolejnych etapach przez enzymy, które katalizują ogromną większość reakcji metabolicznych i tak znacząco obniżają ich barierę energetyczną, że reakcje te osiągają stan równowagi z  $10^6$ - $10^{14}$  większą szybkością niż reakcje niekatalizowane. Enzymy są wytwarzane przez wszystkie organizmy i albo pełnią rolę katalizatorów wewnątrz komórek, w których zostały zsyntetyzowane (enzymy wewnątrzkomórkowe), albo są eksportowane poza te komórki (enzymy pozakomórkowe). Efektem trwającej miliony lat naturalnej ewolucji enzymów jest ich wysoka chemo-, regio- i enancjo-selektywność, a także ściśle dostosowanie do warunków bytowania wytwarzających je organizmów. Większość enzymów zapewnia szybki przebieg reakcji chemicznych w łagodnych warunkach pH, temperatury i ciśnienia. Wyjątkiem pod tym ostatnim względem są enzymy wytwarzane przez drobnoustroje ekstremofilne, czyli ekstremozymy.

Ponieważ większość enzymów ze źródeł naturalnych wykazuje zbyt małą aktywność i stabilność w warunkach przemysłowych, zaczęto je intensywnie udoskonalać i dosto-

sowywać do potrzeb konkretnych procesów technologicznych. Osiągane jest to albo na drodze tzw. ukierunkowanej ewolucji enzymów, czyli z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej, albo na drodze chemicznej modyfikacji enzymów. W wyniku zastosowania tej ostatniej metody otrzymuje się synzimy, czyli enzymy semisyntetyczne. Do grupy tej zaliczane są także otrzymywane „w probówce” peptydy, których sekwencja i struktura przestrzenna wzorowana jest na fragmentach cząsteczek enzymów.

W przypadku enzymów wewnątrzkomórkowych, często z technologicznego i ekonomicznego punktu widzenia, bardziej korzystne jest wykorzystanie ich w postaci całych komórek lub ich fragmentów. Ta ostatnia forma biokatalizatora umożliwia m.in. katalizę określonej sekwencji reakcji i ułatwia regenerację niezbędnych koenzymów. Ponadto, zarówno enzymy, jak i całe komórki lub ich fragmenty unieruchamia się na różnych nośnikach, otrzymując preparaty, które można wykorzystywać wielokrotnie w procesie technologicznym. Wybór formy biokatalizatora dokonywany jest w oparciu o ekonomiczną analizę procesu technologicznego, uwzględniającą m.in. koszt produkcji i stabilność operacyjną biokatalizatora. Wydajność i opłacalność procesu opartego o biokatalizę można też podnieść zmieniając warunki tego procesu, np. stosując podwyższone ciśnienie, środowisko dwufazowe (rozpuszczalnik organiczny-woda) lub wykorzystując jako rozpuszczalniki ciecze nadkrytyczne, gazy, ciekłe kryształy, ciecze jonowe albo rozpuszczalniki

nadfluoranowe. Ponadto, enzymy są stosowane do katalizy reakcji zachodzących w fazie stałej (REENTS i współaut. 2002). W tym ostatnim przypadku, poddawane transformacji cząsteczki substratów są związane z matrycą polimerową za pomocą specyficznych linke-

rów, które po zakończeniu określonych faz procesu poddaje się enzymatycznemu rozkładowi w ściśle określonym miejscu. Upraszcza to bardzo etap oczyszczania gotowego produktu.

## EKSTREMOZYMY

Pierwsze przemysłowe preparaty enzymatyczne pochodzenia mikrobiologicznego otrzymywano na drodze hodowli drobnoustrojów mezofilnych. Enzymy te ulegały dość szybkiej inaktywacji (i) w temperaturze powyżej 50°C, (ii) zbyt kwasowym lub zasadowym pH lub (iii) przy podwyższonym zasoleniu środowiska reakcji. Poznanie mikroorganizmów bytujących w tzw. środowiskach ekstremalnych, takich jak adaptowane do zimna psychrofile i psychrotrofy, preferujące wysoką temperaturę termofile i hipertermofile, bytujące w środowiskach o ekstremalnym pH alkalifile i acidofile, wymagające zasolenia halofile, odporne na suszę kserofile i adaptowane do wysokiego ciśnienia barofile, zwane również piezofilami, umożliwiło zbadanie właściwości wytwarzanych przez nie enzymów. Stwierdzono, że optymalne warunki działania i stabilności tych enzymów są bardzo interesujące dla biotechnologów. Poznanie struktury pierwszorzędowej i przestrzennej tych enzymów oraz badania kinetyczne pozwoliły poznać zasady molekularnej i kinetycznej adaptacji do ekstremalnych warunków środowisk, w których enzymy te działają. Dane te są wykorzystywane podczas konstruowania zmutowanych enzymów, które mają działać z najwyższą efektywnością w ekstremalnych warunkach technologicznych.

Największe zainteresowanie biotechnologów wzbudziły enzymy termofilne i hipertermofilne, wykazujące najwyższą aktywność w przedziale temperatur od 80 do 105°C, a w niektórych przypadkach wytrzymujące inkubację nawet w 121°C. Wysoka termostabilność tych białek katalitycznych umożliwia prowadzenie procesów technologicznych w warunkach ograniczających zakażenia mikrobiologiczne. Ponadto, w wysokiej temperaturze większa jest energia kinetyczna reagujących cząsteczek i ich rozpuszczalność, co sprzyja lepszej wydajności katalizowanego procesu. Psychrozymy, czyli enzymy wykazujące relatywnie wysoką aktywność katalityczną w przedziale temperatury od 0 do 15°C, także budzą zainteresowanie biotech-

nologów, gdyż i w tych warunkach rozwój zakażeń mikrobiologicznych jest ograniczony, a ponadto substancje termolabilne nie są narażone na rozkład termiczny. Enzymy adaptowane do zimna mogą działać podczas przechowywania modyfikowanego surowca w chłodzie. Ponadto, dzięki na ogół niskiej termostabilności, ulegają one stosunkowo łatwo denaturacji termicznej w temperaturze 30–40°C.

Przykładem intensywnie poszukiwanego, psychrofilnego enzymu jest  $\beta$ -galaktozydaza, którą można by zastosować do hydrolizy laktozy w temperaturze bliskiej 4°C. Laktoza, czyli cukier mleczny nie może być spożywana przez osoby cierpiące na niedobór trawiennej  $\beta$ -galaktozydazy, gdyż powoduje zaburzenia gastryczne, w tym wzdęcia i biegunkę. Nietolerancja laktozy występuje u około 30% ogółu populacji na kuli ziemskiej, więc enzymatyczne usuwanie tego dwucukru z mleka i jego przetworów stanowi przedmiot wielu badań. Proces ten powinien być prowadzony w chłodzie, tak by mleko nie traciło wartości odżywczych i nie nabierało niekorzystnych cech sensorycznych. Dotychczas stosowane w tym celu  $\beta$ -galaktozydazy mezofilnych drobnoustrojów wykazują bardzo niewielką aktywność w tak niskiej temperaturze i dlatego próbuje się je zastąpić odpowiednimi psychrozymami.

Równie ważnym zastosowaniem psychrozymów, umożliwiającym oszczędność energii, jest wykorzystanie ich do prania na zimno. W tym celu próbuje się używać zimnolubne enzymy rozkładające białka (proteinyazy), triacyloglicerole (lipazy) i skrobię (amylazy).

Również pozostałe grupy ekstremozymów zaczynają być stosowane w praktyce, m.in. do katalizy w środowiskach o wysokim lub niskim pH, wysokim zasoleniu lub bardzo małej zawartości wody. Na ogół, handlowe preparaty ekstremozymów otrzymywane są na drodze hodowli organizmów transgeniczych, zapewniających wyższą wydajność biosyntezy i niższe koszty produkcji niż tzw. dzikie szczepy. Należy podkreślić, że wyizolowane

z organizmów ekstremofilnych geny poszczególnych enzymów również poddaje się mutagenizacji celem uzyskania biokatalizatorów

jeszcze lepiej dopasowanych do wymogów określonych procesów technologicznych.

### UKIERUNKOWANA EWOLUCJA ENZYMÓW

Podstawowym sposobem modyfikacji właściwości enzymów przemysłowych, umożliwiającym dostosowanie ich aktywności, stabilności i enancjo-selektywności do potrzeb konkretnych procesów, jest wprowadzanie określonych zmian w ich strukturze pierwszorzędowej na drodze modyfikacji sekwencji nukleotydowej w genie. Proces ten nazywany jest ukierunkowaną ewolucją enzymów. Do biosyntezy zmutowanych białek wykorzystywane są drobnoustroje transgeniczne. Należy podkreślić, że obecnie ogromna większość enzymów stosowanych przez przemysł, to enzymy wytwarzane przez te właśnie drobnoustroje. Dobór właściwego gospodarza zastępczego, zwłaszcza celem heterologicznej ekspresji genów eukariotycznych, wymaga często sprawdzenia wielu organizmów (bakterii i grzybów), gdyż w wyniku udanej transkrypcji i translacji genu można uzyskać agregaty nieprawidłowo sfałdowanych, a tym samym nieaktywnych katalitycznie cząsteczek białka, zawieszonych w cytoplazmie i określanych mianem ciałek inkluzyjnych.

Nowoczesne metody stosowane w celu wprowadzania pożądaných mutacji do sekwencji nukleotydowej genów kodujących białka enzymatyczne zostały przedstawione w Tabeli 1 (KAUR i SHARMA 2006). Ze względów praktycznych zachowano anglojęzyczne nazwy tych metod.

Każda z metod ukierunkowanej ewolucji daje obszerne, najczęściej liczące setki tysięcy komórek, biblioteki klonów. Ich przeszukiwanie pod kątem izolacji najlepszego

producenta określonego enzymu jest zautomatyzowane, zaś hodowla klonów prowadzona jest na mikropłytkach, które pozwalają zaoszczędzić składniki podłoża do hodowli i umożliwiają automatyczny odczyt wyników skringingu. Metody detekcji aktywności poszukiwanych enzymów są ciągle doskonalone, gdyż metody tradycyjne są zbyt mało czułe w tym celu. W wielu przypadkach jako substraty wykorzystuje się pochodne umożliwiające odczyt fluorescencji po uwolnieniu produktu reakcji.

Dużym ułatwieniem podczas skringingu jest ekspozycja zmutowanych białek enzymatycznych na powierzchni faga lub komórek drożdżowych, na mRNA lub rybosomie, a także wymieniona w tabeli kompartmentyzacja kompleksu DNA-białko *in vitro* w mikro-kroplach wody. Podstawą bardzo często stosowanej ekspozycji na fagu jest włączenie poszczególnych wariantów zmutowanego enzymu do DNA faga, tak by uzyskać białko fuzyjne z jednym z białek płaszczka wirusa. Zasada ekspozycji wariantów enzymu na powierzchni komórki drożdżowej jest podobna.

Niezależnie od kreowania wciąż nowych mutantów poszczególnych enzymów, efektywność ich działania usiłuje się też zwiększyć opracowując nowe metody immobilizacji, modyfikacji chemicznej, np. sieciowania kryształów (CLECs) lub agregatów (CLEAS) tych białek, a także poprzez inżynierowanie środowiska reakcji, polegające m.in. na zastosowaniu innych rozpuszczalników niż woda lub bufory.

### BIOKATALIZA W ŚRODOWISKU ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH

Naturalnym środowiskiem działania enzymów jest środowisko wodne, jednakże białka te wykazują aktywność katalityczną także w środowisku rozpuszczalników organicznych, w którym struktura większości białek ulega usztywnieniu i na ogół wykazują one odmienną (często podwyższoną) enancjo-selektywność oraz wyższą niż w środowisku wodnym termostabilność. Zastosowanie rozpuszczalników organicz-

nych umożliwia prowadzenie reakcji, które praktycznie nie zachodzą w środowisku wodnym, ze względu na bardzo niską rozpuszczalność substratów lub niekorzystne położenie stanu równowagi reakcji. Ponadto, rozpuszczalnik organiczny można po zakończeniu procesu dość łatwo odparować, co ułatwia oczyszczanie i zatężanie produktów reakcji (CASTRO i KNUBOVETS 2003).

Tabela 1. Metody stosowane w ukierunkowanej ewolucji enzymów.

Metoda	Zasada metody i uzyskiwane wyniki
Error Prone PCR	Zastosowanie termostabilnych polimeraz o niskiej aktywności korekcyjnej, np. polimerazy <i>Taq</i> , pozwala na wprowadzenie do łańcucha DNA stosunkowo dużej ilości błędnych nukleotydów podczas PCR (np. $0,1 \times 10^{-4}$ - $2 \times 10^{-4}$ na jeden cykl procesu katalizowanego przez w/w enzym).
Cassette Mutagenesis	Mutacje są wprowadzane do stosunkowo krótkich fragmentów genów, odpowiadających najważniejszym dla aktywności katalitycznej fragmentom łańcucha polipeptydowego białka enzymatycznego.
DNA Shuffling	„Tasowanie” fragmentów homologicznych genów.
Staggered Extension Protocol (StEP)	Biblioteka chimerycznych genów jest wynikiem wielokrotnej denaturacji sekwencji matrycowego DNA przedzielonych bardzo krótkimi etapami łączenia uzyskanych fragmentów. W każdym cyklu rosnące fragmenty DNA przyłączają się do innej matrycy.
Synthetic Shuffling	„Tasowaniu” poddaje się serię syntetycznych oligonukleotydów, kodujących wszystkie warianty sekwencji obserwowane w przypadku dwu genów rodzicielskich, które mogą być np. niedostępne do badań.
Structure Based Combinatorial Protein Engineering (SCOPE)	Pozwala uzyskać bibliotekę chimerycznych genów niehomologicznych (np. uzyskanych w wyniku wymieszania fragmentów genów polimerazy DNA ze szczura i wirusa).
Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes (ITCHY)	Dwa geny rodzicielskie trawi się egzonukleazą III uzyskując bibliotekę genów różniących się długością, a następnie łączy się fragmenty 5'-końcowe jednego genu i 3'-końcowe drugiego.
SCRATCHY	Kombinacja ITCHY i DNA shuffling.
Sequence Homology-Independent Protein Recombination (SHIPREC)	Umożliwia generowanie hybryd dwu genów o bardzo zróżnicowanej sekwencji. W wyniku wieloetapowej procedury uzyskuje się geny o zamienionych końcach, np. fragment z końca 5' w genie rodzicielskim jest na końcu 3' w hybrydzie.
In Vitro Compartmentalization (IVC)	Zastosowanie mikroemulsji wody w oleju umożliwia izolowanie kompleksu utworzonego przez DNA i kodowane przezeń białko, który powstaje podczas syntezy tego białka w mikro-przestrzeni naśladującej komórkę. Pozwala to na szybką identyfikację genów poszczególnych enzymów.
Random Chimeragenesis on Transient Templates (RACHITT)	Wykorzystanie genu enzymu wyizolowanego z jednego gatunku jako matrycy, zaś analogicznego genu z drugiego gatunku organizmu jako źródła fragmentów DNA, pozwala uzyskać po kilku etapach gen zbudowany z krótkich fragmentów obu genów rodzicielskich.
Orthogonal Combinatorial Mutagenesis (OCM)	Pozwala uzyskać mutacje na poziomie kodonów, dzięki zastosowaniu pochodnych deoksynukleozydów.
Assembly of Designed Oligonucleotides (ADO)	Pozwala uniknąć hybrydyzacji w obrębie pojedynczego genu i umożliwia łączenie dłuższych fragmentów genów rodzicielskich dzięki kontrolowanemu nakładaniu się określonych oligonukleotydów.
Combination Libraries Enhanced by Combination in Yeast (CLERY)	Łączy etapy rekombinacji prowadzone <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> .
Sequence-Independent Site-Directed Chimeragenesis (SISDC)	Umożliwia rekombinację genów kodujących enzymy o minimalnym pokrewieństwie, których fragmenty łączą się w ściśle określonych miejscach.
Sequence Saturation Mutagenesis (SeSaM)	Umożliwia wprowadzenie mutacji w dowolnym kodonie.
Codon Shuffling	Umożliwia wydłużenie częściowo strawionego genu rodzicielskiego o dowolny fragment DNA.
<i>In Vivo</i> DNA Shuffling	Konstrukcja chimery dwu genów homologicznych prowadzona jest z zastosowaniem komórek <i>E. coli</i> .



Podstawowym zagadnieniem jest dobór właściwego rozpuszczalnika organicznego i stężenia wody w środowisku reakcji. Większość białek, w tym enzymatycznych, ulega nieodwracalnej denaturacji pod działaniem szeregu rozpuszczalników organicznych, a ponadto zastosowanie tych ostatnich podlega ścisłej regulacji, związanej z planowanym zastosowaniem produktu otrzymanego w wyniku reakcji, np. czy będzie to produkt spożywczy, czy półprodukt poddawany dalszej konwersji celem produkcji leku. Z kolei, obecność wody jest niekorzystna z punktu widzenia niektórych reakcji, np. reakcji syntezy wiązań, katalizowanych przez enzymy z klasy hydrolaz, np. lipazy, proteinazy lub glikozydazy, ale jednocześnie każdy enzym wy-

maga tzw. niezbędnej warstewki wody, związanej z jego cząsteczką, bez której nie wykazuje jakiegokolwiek aktywności katalitycznej.

Aby móc osiągnąć minimalne i jednocześnie gwarantujące aktywność katalityczną enzymu stężenie wody w środowisku reakcji, często stosowane są liofilizowane lub odwadniane (np. acetonem) preparaty enzymatyczne. Zauważono przy tym, że związki, takie jak np. sole mineralne, bufor o odpowiednim pH, glikol polietylenowy itp., dodane do preparatu enzymu poddawanego liofilizacji mają silny wpływ na aktywność katalityczną w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Zjawisko to określa się mianem tzw. „pamięci molekularnej enzymu”.

### BIOKATALIZA W NADKRYTYCZNYM CO<sub>2</sub>

Ponieważ wielu procesów nie można prowadzić z zadowalającą opłacalnością ani w środowisku rozpuszczalników organicznych, ani w środowisku wodnym, więc jako alternatywne rozpuszczalniki zastosowano płyny nadkrytyczne, czyli takie, których temperatura i ciśnienie są wyższe niż w stanie krytycznym. Ich gęstość jest porównywalna z gęstością rozpuszczalników organicznych, a ponadto charakteryzuje je wysoka ściśliwość i wysoka wartość współczynnika dyfuzji oraz

bardzo niska lepkość, a także brak toksyczności. Jako medium reakcji enzymatycznych, najczęściej stosowany jest nadkrytyczny CO<sub>2</sub>, który okazał się stosunkowo tanim medium, zapewniającym wysoką szybkość wielu reakcji enzymatycznych, w tym np. katalizowanych przez lipazy i inne enzymy katalizujące reakcje licznych związków nierozpuszczalnych w wodzie. Jego wadą jest jednak ograniczona rozpuszczalność związków o wysokiej hydrofobowości i hydrofilowości.

### BIOKATALIZA W CIECZACH JONOWYCH

Ciecze jonowe są to związki zbudowane wyłącznie z jonów, które występują w stanie ciekłym w temperaturze do około 300°C. Rozpuszczają się w nich liczne związki organiczne i nieorganiczne. Ponadto modyfikując skład cieczy jonowej można uzyskać „idealne” środowisko dla określonej reakcji. Ciecze

te zastosowano m.in. w produkcji aspartamu z udziałem termolizyny oraz w reakcjach katalizowanych przez lipazy. Te ostatnie enzymy wykazują także zadowalającą aktywność w środowisku rozpuszczalników nadfluorowanych, takich jak np. 1,1,1,2-tetrafluoroetan (Yu i współaut. 2007).

### BIOSYNTENZA KOMBINATORYJNA

Biosynteza kombinatoryjna polega na wykorzystaniu enzymów i drobnoustrojów do wieloetapowej biotransformacji określonych produktów wyjściowych (ALTREUTER i CLARK 1999). W jej wyniku otrzymuje się tzw. biblioteki produktów, przydatnych do różnych celów, np. chiralnych bloków budulcowych. Dzięki biosyntezie kombinatoryjnej stała się możliwa synteza wielu segmentów chiralnych, których synteza chemiczna jest wyjątkowo

żmudna. Specyficzność substratowa enzymów powoduje, że w odróżnieniu od syntezy chemicznej, biokataliza pozwala uniknąć szeregu reakcji protekcji grup funkcyjnych w cząsteczkach substratów. Ponadto wysoka enancjo-selektywność enzymów pozwala rozdzielić mieszaninę racemiczną substratu podczas procesu biokonwersji, gdyż enzymy wybiórczo przekształcają pojedyncze enancjomery związków chiralnych i dają w wyniku

reakcji albo czyste enancjomery takich związków, albo mieszaniny o wyraźnej przewadze jednego z nich. Także enzymatyczna transformacja związków prochiralnych daje czyste enancjomery. Niewystarczającą dla technologów enancjo-selektywność wielu enzymów ze źródeł naturalnych, np. lipaz, esteraz, oksydoreduktaz itp., zwiększono na drodze ukierunkowanej ewolucji i/lub doboru odpowiednich warunków procesu. W biosyntezie kombinatoryjnej szeroko wykorzystywane są niewodne środowiska reakcji, które pozwalają otrzymać znacznie szerszy wachlarz produktów przy zastosowaniu tego samego enzymu i substratu w porównaniu ze środowiskiem wodnym. Ilość różnych pochodnych jednego związku wyjściowego może być wyższa niż 1000. Na przykład, na drodze biokonwersji (+)-(2-endo,3-exo)-bicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dimethanolu (BOD) uzyskano bibliotekę 1222 związków.

Podstawowymi typami katalizowanych przez enzymy reakcji, stosowanymi w biosyntezie kombinatoryjnej, są reakcje acylacji, glikozylacji, utleniania i redukcji oraz halogenacji. Reakcje acylacji pozwalają otrzymywać różnorodne estry, węglany, amidy i karbaminiany. Glikozylacja jest źródłem alfa- lub beta-glikozydów, aminocukrów i kwasów cukrowych. Reakcje katalizowane przez enzymy oksydoredukcyjne polegają na hydroksylacji, utlenieniu, demetylacji itp., zaś halogenazy wprowadzają do cząsteczek substratów atomy chloru, bromu lub jodu. Zastosowanie różnej kolejności i kombinacji tych reakcji daje zróżnicowane produkty.

Wiele nowych możliwości daje zastosowanie enzymów katalizujących w naturze reakcje syntezy lub degradacji związków ogólnie uważanych za toksyczne, jak np. nitryle, nitrobenzen, organiczne cyjano-pochodne itp. (WACKETT 2004). Nadal nie poznano też enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę wielu naturalnych grup funkcyjnych, których synteza chemiczna jest dość trudna. Być może uda się rozwiązać ten problem na drodze konstrukcji odpowiednich biokatalizatorów.

W biosyntezie kombinatoryjnej oprócz enzymów wykorzystywane są także abzymy, rybozymy, deoksyrybozymy i synzymy. Te pierwsze wykazują chemo- i enancjo-specyficzność porównywalną do enzymów. Abzymy okazały się wydajnymi katalizatorami reakcji syntezy wiązań pomiędzy atomami węgla, którą katalizują też enzymy należące do aldolaz.

Isolacja coraz to nowych enzymów ze źródeł naturalnych (w przypadku enzymów mikrobiologicznych otrzymywane są one nie tylko na drodze hodowli komórek, ale także poprzez izolację metagenomu, czyli środowiskowego DNA) oraz rosnąca pula enzymów wygenerowanych na drodze ukierunkowanej ewolucji, a także nowe metody ich immobilizacji oraz tzw. inżynierowanie środowiska reakcji sprawiają, że perspektywy biosyntezy kombinatoryjnej wydają się niemal nieograniczone. Dodatkową zaletą tej techniki jest brak zagrożenia dla środowiska naturalnego.

## PROMISKUITYZM ENZYMÓW

Jednym z podstawowych dogmatów w enzymologii jest założenie, że enzymy wykazują wysoką specyficzność w odniesieniu do struktury substratu i kierunku jego transformacji. Jednakże coraz więcej grup badawczych donosi o wysokiej efektywności enzymów w katalizie „niekonwencjonalnych” reakcji, co przeczy temu dogmatowi i co określono mianem promiskuityzmu (wielospecyficzności) enzymów (HULT i BERGLUND 2007). Wyróżnia się trzy podstawowe typy promiskuityzmu: zależny od warunków reakcji, katalityczny i substratowy. Ten pierwszy jest wynikiem zastosowania niekonwencjonalnego środowiska reakcji, np. rozpuszczalnika organicznego, ekstremalnych warunków temperatury i/lub pH itp. Termin ka-

talityczny promiskuityzm enzymów oznacza zdolność danego enzymu do katalizowania więcej niż jednego typu transformacji chemicznej określonego substratu lub grupy substratów, przy czym każda z tych transformacji ma inny stan przejściowy. Ponadto, enzymy wykazują zdolność do katalizowania transformacji chemicznej substratu lub grupy substratów o strukturze odmiennej niż „tradycyjne”, czyli tzw. promiskuityzm substratowy. Promiskuityzm katalityczny może być cechą naturalną lub wynikać z modyfikacji cząsteczki enzymu na drodze mutacji w obrębie jego genu (tzw. promiskuityzm indukowany). W Tabeli 2 zamieszczono przykłady katalitycznej wielospecyficzności enzymów.

Tabela 2. Przykłady katalitycznego promiskuityzmu enzymów.

Enzym	Naturalna aktywność	Dodatkowa aktywność
Esteraza	Hydroliza estrów	Hydroliza beta-laktamów
Lipaza	Hydroliza triacylogliceroli	Hydroliza beta-laktamów, synteza wiązań C-N, C-S i C-C, rozdział chóralnych alkoholi i kwasów karboksylowych, transacylacja w fazie gazowej i w środowisku rozpuszczalników organicznych
Subtilizyna	Hydroliza peptydów	Hydroliza sulfonamidów
Pepsyna	Hydroliza peptydów	Hydroliza sulfidów
Anhydraza węglanowa	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ reakcja typowa dla peroksydazy
Aminopeptydaza	Hydroliza peptydów	Oksydaza (utlenianie)
Liczne hydrolazy glikozydowe	Hydroliza wiązań glikozydowych	Synteza wiązań glikozydowych

Modyfikacje enzymów i tzw. inżynierowanie środowiska reakcji zwiększają ilość nowych procesów, katalizowanych przez wyda-

wałoby się dobrze już znane enzymy. Dzięki temu poszerza się gama produktów biokatalizy.

#### PODSUMOWANIE

Dzięki swej wysokiej efektywności i specyficzności katalitycznej, enzymy znalazły szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, medycynie, analityce, ochronie środowiska, a także w gospodarstwie domowym, czego najlepszym przykładem są enzymy dodawane do środków piorących, odplamiaczy, czy przypraw, np. stosowanych do zmiękczenia mięsa. Zastąpienie wielu tradycyjnych, przemysłowych procesów technologicznych procesami opartymi o biokatalizę umożliwi wydajniejszą, czystsza i bardziej opłacalną produkcję wielu produktów spożywczych, farmaceutyków, biopolimerów oraz innych związków chemicznych i przyczynia się do

ochrony ekosfery. Ponadto, wykorzystując biokatalizę można zrekultywować już zanieczyszczone środowiska, zarówno wodne jak i lądowe.

Warunkiem w pełni efektywnego wykorzystania w praktyce możliwości katalitycznych już znanych jak i nowo odkrywanych enzymów, jest szeroki dostęp do informacji na ten temat. Zapewniają go m.in. ciągle udoskonalane bazy danych, takie jak m.in. BRENDA, UM-BBD, Ligand Chemical Database, BioCatalysis i inne (WACKETT 2004), w których deponowane są informacje na temat budowy enzymów i katalizowanych przez nie reakcji.

#### BIOCATALYSIS

##### Summary

The use of enzymes, either derived from natural sources or generated through directed evolution methods, has increased significantly over the past decades. Replacing the aqueous milieu with organic solvents, ionic liquids, supercritical fluids, fluoro-hydrocarbons etc. enables biocatalysis to increase the chemo-, regio- and enantio-specificity and catalytic efficiency of many enzymes. Combinatorial biocata-

lysis uses enzymes and whole microbial cells to generate libraries of derivatives of many compounds. Enzyme catalytic promiscuity, i.e. capability of catalyzing new reactions of new substrates, has been recognized as a valuable research and synthesis tool. The systematic organization of information pertaining to enzymes' function and structure is of great importance for further development of biocatalysis.

## LITERATURA

- ALTREUTER D. A., CLARK D. S., 1999, *Combinatorial biocatalysis: taking the lead from Nature*. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 130-136.
- CASTRO G. R., KNUBOVETS T., 2003. *Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures*. Crit. Rev. Biotechnol. 23, 195-231.
- HULT K., BERGLUND P., 2007, *Enzyme promiscuity: mechanism and applications*. Trends Biotechnol. 25, 231-238.
- KAUR J., SHARMA R., 2006. *Directed evolution: an approach to engineer enzymes*. Crit. Rev. Biotechnol. 26, 165-199.
- REENTS R., JEYARAJ D. A., WALDMANN H., 2002. *Enzymatically cleavable linker groups in polymer-supported synthesis*. Drug Discov. Today 7, 71-74.
- WACKETT L. P., 2004. *Novel biocatalysis by database mining*. Curr. Opin. Biotechnol. 15, 280-284.
- YU G., XUE Y., XU W., ZHANG J., XUE C. H., 2007. *Stability and activity of lipase in subcritical 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a)*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 793-798.