

AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ ANTCZAK,
KATARZYNA KOŁUCKA, TADEUSZ TRZMIEL

ENZYMATYCZNA SYNTEZA ESTRU ETYLOWEGO N-ACETYLO-L-TYROZYNY W ORGANICZNYCH MEDIACH

Streszczenie

Badano estryfikację N-acetylo-L-tyrozyny katalizowaną przez natywną oraz immobilizowaną na szkle alkalostabilną proteinazę szczepu *B.alcalophilus* PB92 w środowisku etanolu. Zaobserwowano, że natywna proteinaza katalizowała syntezę estru etylowego N-Ac-L-Tyr (ATEE) w środowisku zawierającym 6% wody, z prędkością początkową $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1}$. Natomiast immobilizowana proteinaza wykazywała wyższą aktywność i stabilność w porównaniu z jej natywną formą. Badano również aktywność katalityczną natywnej proteinazy w układach kosolwentów (stężenie wody 6%): etanol - aceton// - acetonitryl// -DMF w stosunku 1:1 (v/v). Nie zaobserwowano syntezy ATEE w obecności acetonu i DMF-u.

Wstęp

Już w 1908 roku Ikeda odkrył i potwierdził, na przykładzie soli monosodowej kwasu L-glutaminowego (MSG), duże znaczenie aminokwasów w kreowaniu smaku produktów żywnościowych. MSG był głównym komponentem dodatków smakowych tradycyjnej japońskiej żywności pochodzącej z morza. Dzisiaj aminokwasy stosowane w przetwórstwie żywności (*food processing*), nie tylko wzmacniają jej walory odżywcze, ale również udoskonalają naturalny smak. Dużą rolę jako dodatki smakowe pełnią dipeptydy, czego przykładem jest aspartam (AspPheOMe). Obecnie produkowany na skalę przemysłową jest cenionym substytutem sacharozy. W zależności od składu aminokwasowego dipeptydy mogą charakteryzować się smakiem słodkim, słonym, gorzkim oraz kwaśnym [8]. W ostatnich latach dipeptydy otrzymuje się na drodze enzymatycznej syntezy, wykorzystując m.in. enzymy proteolityczne, np.: termolizynę,

α -chymotrypsynę, subtilizynę. Procesy te prowadzi się w układach różnych solwentów o niskiej zawartości wody [17].

W ciągu ostatniej dekady „enzymologia niewodna” wyłoniła się jako jeden z głównych obszarów badań biotechnologicznych. Postęp jaki osiągnięto w tej dziedzinie doprowadził do pojawienia się wielu interesujących możliwości praktycznego zastosowania enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych. Środowisko bardziej lub mniej polarne jest tylko pozornie nietypowe dla katalizy enzymatycznej, ponieważ znaczna część enzymów *in vivo* jest zasocjowana ze strukturami błon komórkowych lub cytoplazmatycznych [13].

Zastosowanie biokatalizatorów (enzymów, organelli komórkowych, całych komórek lub fragmentów tkanek) w środowisku organicznym o obniżonej zawartości wody posiada kilka istotnych zalet:

- umożliwia przesunięcie równowagi termodynamicznej w kierunku reakcji syntezy (w przypadku stosowania enzymów hydrolitycznych),
- wzrasta rozpuszczalność hydrofobowych reagentów,
- ułatwia odzysk produktu i biokatalizatora,
- zmniejsza ryzyko zakażeń mikrobiologicznych,
- stabilizuje biokatalizator [1, 6, 7].

Enzymy w układach organicznych są zdolne katalizować procesy, które praktycznie nie przebiegają w roztworach wodnych, np. enzymy proteolityczne uczestniczą w reakcjach transestryfikacji, estryfikacji, syntezy peptydów i amidów, których równowaga termodynamiczna w wodzie jest przesunięta na korzyść hydrolizy [9, 10, 17]. Jednakże, ich aktywność katalityczna jest niższa w środowisku solwentów nawet o kilka rzędów wielkości porównując z tą, jaką posiadają w środowisku wodnym. Badania Klibanova i wsp. [3, 12, 19] wykazały, iż α -chymotrypsyna i subtilizyna w oktanie oraz wielu innych rozpuszczalnikach są o ok. 10^5 mniej aktywne. Obniżenie reaktywności enzymu uznaje się za główną wadę enzymatycznej katalizy w układach organicznych i jest to jeden z powodów uniemożliwiających jej aplikację na większą skalę.

Struktura cząsteczki białka w roztworze wodnym zależy od skomplikowanej sieci wiązań wodorowych oraz elektrostatycznych i hydrofobowych interakcji; są one ważnym czynnikiem determinującym katalitycznie aktywną konformację cząsteczki enzymu. Generalnie rozpuszczalniki nie posiadają zdolności tworzenia wiązań wodorowych i z powodu niskich stałych dielektrycznych prowadzą do silnych oddziaływań elektrostatycznych usztywniających strukturę białka [12]. Według badań Laane'a [15], aktywność katalityczna enzymów w takich warunkach jest efektem ich zdolności do silnego wiązania „wody niezbędnej” (*essential water layer*), tworzącej tzw. płaszcz hydratacyjny budowany przez kilka warstw cząsteczek wody przylegających bezpośrednio do powierzchni cząsteczki białka, który zachowują nawet wtedy, gdy są zawieszony w niewodnym rozpuszczalniku. Obok konformacyjnych zmian enzymu i redukcji

jego „giętkości”, istnieje szereg innych czynników fizykochemicznych, takich jak, ograniczenia dyfuzyjne, blokowanie centrum aktywnego, problem związany z pH, destabilizacja stanu tranzycji, które powodują obniżenie enzymatycznej aktywności w organicznych solwentach.[3, 12]. Aby zminimalizować wpływ tych czynników stosuje się szereg metod. Jedną z nich jest immobilizacja enzymu. Unieruchamianie enzymów jest doskonałą metodą ich stabilizacji w obecności różnych rozpuszczalników, a ponadto pociąga za sobą wzrost trwałości termicznej i odporności na denaturację białka enzymatycznego. W celu zachowania właściwości katalitycznych enzymów w systemach hydro-organicznych, przy wysokich stężeniach składników organicznych, konieczne jest utrwalenie ich aktywnej konformacji. Ponadto, reakcje katalizowane immobilizowanymi enzymami są łatwiejsze do kontroli i automatyzacji [7].

W artykule prezentujemy wyniki badań nad syntezą estru etylowego N-acetylo-L-tyrozyny (ATEE) katalizowaną przez alkalostabilną proteinazę szczepu *B. alcalophilus* PB92. Obejmują one również eksperymenty nad określeniem wpływu rozpuszczalników hydrofilowych, tj. acetonu, acetonitrylu i N,N-dimetyloformamidu (DMF) na syntezę ATEE, którą przyjęto za układ modelowy.

Materiały i metody badań

Serynowa proteinaza alkalostabilna PB92 (EC 3.4.21.62) szczepu *B. alcalophilus* PB92 [18] (preparat handlowy Maxacal) o aktywności właściwej 12 mj A/mg białka (1 mg preparatu zawiera 0,045 mg białka). N-acetylo-L-tyrozyna (AT) i ester etylowy N-acetylo-L-tyrozyny (ATEE) firmy Sigma. Rozpuszczalniki organiczne czda., firmy POCH, osuszone sitem molekularnym 4Å. Szkło porowate Cormay (Lublin), zestaw do ultrafiltracji (Aldrich, Amicon).

Metody analityczne

Aktywność proteolityczną enzymu oznaczono metodą Ansona [4], stosując jako substrat zdenaturowaną mocznikiem hemoglobinę wołową.

Za jednostkę aktywności proteolitycznej Ansona [jA] przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ inkubatu, 100 mg hemoglobiny, temperatura 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością początkową, że ilość rozpuszczonego w 5% kwasie trichlorooctowym produktu hydrolizy powstająca w czasie 1 minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina wartość absorbancji odpowiadającą 1mmolowi tyrozyny.

Białko oznaczono metodą Lowry'ego [16].

Stałą Michaelisa-Menten określono w reakcji dla AT w następujących warunkach: stężenia substratu 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 mM, zawartość wody w układzie

reakcyjnym 6%, temperatura 30°C. Wartości K_M i V_{max} wyznaczono z wykresu Lineweavera-Burka.

Produkty reakcji estryfikacji analizowano metodą HPLC (chromatograf Gold Beckman wyposażony w detektor UV-Vis model 166). Próbkę mieszaniny reakcyjnej o objętości $V = 50 \mu\text{l}$, z której białko usunięto metodą ultrafiltracji (membrany PTFE oraz YM), nastrzykiwano bezpośrednio na kolumnę ODS (250×4,6 mm) i eluowano z szybkością $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ w temp. 25°C mieszaniną woda/acetonytryl w stosunku 1:1 (v/v). Otrzymany produkt (ATEE) oraz nie przereagowany substrat (AT) monitorowano przy długości fali $\lambda = 280 \text{ nm}$ (rys. 2).

Immobilizacja enzymu na szkle porowatym metodą diizocyjanianową [2]

1 g nośnika (szkła porowatego posiadającego wolne grupy -OH, $dp = 200\text{--}315 \mu\text{m}$, $D = 63,2 \text{ nm}$) zawieszono w 50 cm^3 acetonu. Następnie dodano po 2 cm^3 trietyloaminy i heksametylenodiizocyjanianu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 45 min w temperaturze pokojowej. Następnie nośnik przemyto acetonem i wodą. Do 3 g uaktywnionego, wilgotnego nośnika dodano $12,5 \text{ cm}^3$ roztworu proteinyazy o stężeniu $20 \text{ mg preparatu cm}^{-3}$ i całość inkubowano w temperaturze 4°C w ciągu 16–18 godzin, mieszając. Immobilizowany na szkle enzym oddzielono od roztworu, przemyto kilkoma porcjami 0,1% roztworu octanu wapnia i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej na 24 godziny.

Enzymatyczna synteza estru etylowego N-Ac-L-Tyr

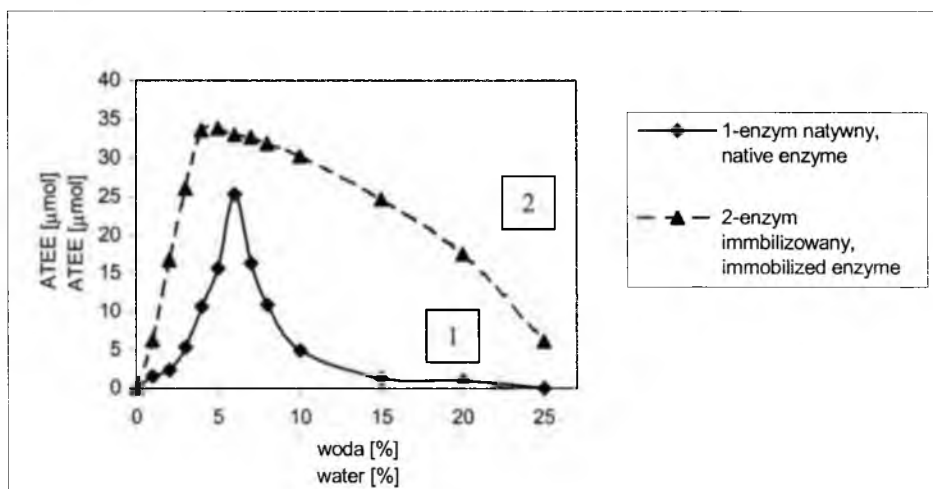
Syntezę prowadzono w szczelnie zamkniętych naczyniach zawierających mieszaninę N-Ac-L-Tyr (2,5–17,5 mM), alkoholu etylowego – stanowiącego jednocześnie substrat oraz środowisko reakcji ($V = 5 \text{ cm}^3$) – i wody (0–25%). Sprawdzano również warianty: etanol-rozpuszczalnik hydrofilowy (aceton, acetonytryl, DMF) w stosunku 1:1 (v/v) z dodatkiem 6% wody. Enzym stosowano w formie preparatu handlowego (22 mg preparatu zawierało 1 mg białka) lub w formie preparatu immobilizowanego na szkle porowatym (30 mg preparatu zawierało ok. 0,7 mg białka). Mieszaninę reakcyjną intensywnie wstrząsano w temperaturze 30°C.

Wyniki i dyskusja

Wpływ zawartości wody na syntezę ATEE

Podczas przemian katalizowanych przez proteinyazy w środowisku niewodnym woda stanowi zarówno element środowiska, jak i jeden z produktów reakcji, a jej znaczenie w katalizie należy uznać za kluczowe. W środowisku rozpuszczalników organicznych wpływa ona nie tylko na wartość stałej równowagi reakcji, ale wysycając

hydrofilowe regiony białka utrzymuje również jego katalityczną konformację. Rys. 1. prezentuje przebieg syntezy ATEE katalizowanej przez wolną oraz immobilizowaną alkalostabilną proteinazę w funkcji stężenia wody w środowisku reakcji. W warunkach, gdzie zawartość wody nie przekraczała 0,5% nie zaobserwowano wyraźnego przyrostu produktu. Enzym w obu formach natywnej i immobilizowanej wykazywał niewielką aktywność katalityczną. Stężenie powstałego produktu było tak małe, że wyniki analizy HPLC mieściły się w granicach błędów. Wraz ze wzrostem zawartości wody, w układzie gwałtownie wzrastała szybkość estryfikacji AT. Reakcja z udziałem natywnej proteinazy przebiegała najszybciej w przedziale stężeń wody od 5 do 7%, osiągając największą szybkość początkową, $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{moli} \cdot \text{min}^{-1}$, w środowisku zawierającym 6% wody. W tym przedziale zmiany zawartości wody w środowisku reakcji o $\pm 2\%$ w sposób znaczący wpływają na efekty syntezy ATEE przez tę formę enzymu. Zarówno obniżenie, jak i wzrost zawartości wody w układzie, poza optymalny zakres (dla każdej formy stosowanego preparatu), powodował stopniowe hamowanie reakcji i spadek ilości syntetyzowanego estru. W obu przypadkach mamy z pewnością do czynienia ze zmianami konformacyjnymi zachodzącymi w białku proteinazy, generowanymi zmianami środowiska reakcji. Przy wysokich stężeniach wody przebiegają



AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda 6%, EtOH 5 cm³, natywny enzym (1 mg białka), immobilizowany preparat 30 mg (0,7 mg białka), temp. 30°C, pomiar po czasie t = 12h.

AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda 6%, EtOH 5 cm³, native enzyme (1 mg of protein), immobilized preparation 30 mg (0,7 mg of protein), temp. 30°C, measurement after 12 h.

Rys. 1. Wpływ zawartości wody na synteze ATEE katalizowaną przez natywną oraz immobilizowaną proteinazę alkalostabilną.

Fig. 1. Influence of water content on synthesis of ATEE catalysed by native and immobilized high-alkaline proteinase.

dotatkowo: reakcja rewersji oraz proces autolizy proteiny [6]. Immobilizacja enzymu na nośniku może zmniejszyć problem autolizy. Wyniki badań wskazują, że unieruchomiona na szkle alkalostabilna proteinaza katalizuje proces estryfikacji AT z większą wydajnością niż enzym nie immobilizowany – szczególnie przy większej zawartości wody w środowisku reakcji. Immobilizacja umożliwia zatem utrwalenie katalitycznie aktywnej konformacji enzymu i w ten sposób czyni go mniej wrażliwym na zmiany środowiska reakcji. Również charakter samego nośnika (hydrofilowy, z wysokim ujemnym ładunkiem elektrostatycznym) może kształtować mikrośrodowisko w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczek białka immobilizowanego biokatalizatora. W przypadku immobilizowanej proteiny zjawisko to wyjaśnia obserwowane przesunięcie wydajności syntezy ATEE w kierunku niższych stężeń wody (4%). Kształt krzywej 2. na rys. 1. wskazuje na większą tolerancję immobilizowanej proteiny na wzrost zawartości wody w układzie reakcyjnym. Preparat ten katalizuje estryfikację AT w środowisku etanolu zawierającym nawet 25% wody.

Wpływ środowiska reakcji (rozpuszczalnika) na syntezę ATEE

Badano estryfikację AT w układach kosolwentów: EtOH - acetonitryl// -aceton// -DMF w porównaniu z tym procesem w środowisku samego etanolu (tab. 1). Woda w każdym układzie stanowiła 6%. W badaniach stosowano natywny preparat proteiny. W środowisku etanolu reakcja przebiegała z najwyższą szybkością początkową równą $2,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. Po 48 godzinnej reakcji uzyskano wydajność przereagowania AT 96%. Układ EtOH-acetonitryl tworzy mniej korzystne warunki działania enzymu w porównaniu ze środowiskiem samego etanolu. Wyznaczone stałe Michaelisa wskazują na dwukrotne obniżenie powinowactwa proteiny do AT, gdy połowę objętości EtOH zastąpiono acetonitrylem. Uzyskane rezultaty wskazują na wybitnie niekorzystny wpływ acetonu i dimetyloformamidu na przebieg syntezy ATEE. W układach etanolu z tymi rozpuszczalnikami otrzymano śladowe ilości produktu.

Być może ilość wody optymalna dla środowiska czystego etanolu jest niekorzystna dla badanych układów kosolwentów. Laane i współpracownicy [11] zaproponowali pewien model oparty na ilościowej zależności fizykochemicznych właściwości indywidualnych rozpuszczalników, a aktywnością biokatalizatorów. W modelu tym miernikiem polarności-hydrofobowości jest wartość $\log P$, którą dla rozpuszczalników organicznych wylicza się z cząstkowych stałych hydrofobowych. Jeżeli rozpuszczalniki charakteryzują się wartościami $\log P > 4$ (apolarne), nie niszczą warstwy wody niezbędnej enzymu. Rozpuszczalniki z $\log P$ o wartościach poniżej 2 (polarne) są niekorzystne dla biokatalizy, ponieważ silnie oddziałują na płaszczyznę hydratacyjną. Mają one zdolność do „odrywania” warstwy wody niezbędnej stabilizującej biokatalizator, prowadząc w ten sposób do jego inaktywacji lub denaturacji. Czynnikiem zabezpieczającym enzym przed tego typu działaniami jest woda zawarta w środowisku reakcji.

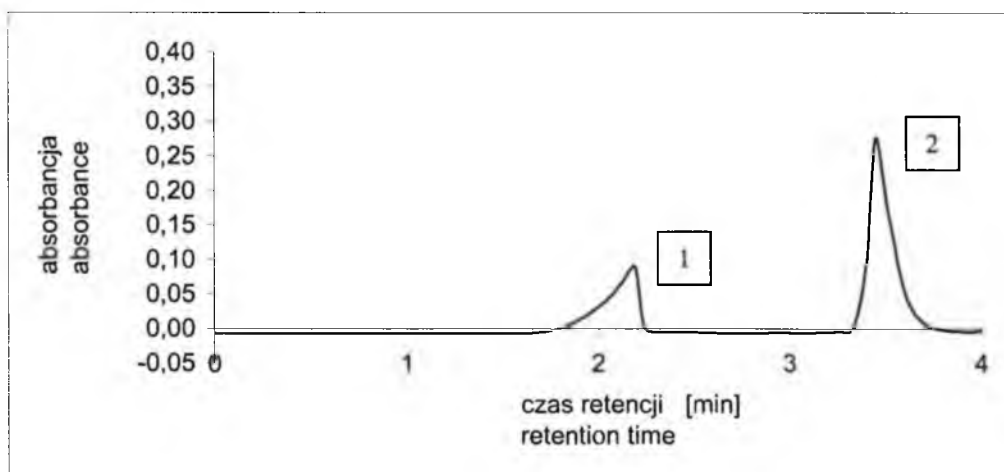
W przypadku rozpuszczalników hydrofilowych stężenie wody w środowisku musi być wyższe w porównaniu z rozpuszczalnikami apolarnymi [19]. Dlatego też należałoby zoptymalizować zawartość wody lub aktywność wody [5] dla każdej mieszaniny rozpuszczalników. W kolejnym etapie badań planuje się kontynuację tych eksperymentów z udziałem immobilizowanej proteiny.

Tabela 1

Wpływ rozpuszczalników na syntezę ATEE.
Influence of solvents on ATEE synthesis.

Rozpuszczalnik Solvent	Szybkość początkowa Initial rate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	K_M [mM]	Log P	Wydajność ATEE ATEE Yield [%]	
				24h	48h
Etanol Ethanol	$2,5\cdot 10^{-2}$	1,1	-0,24	70	96
Etanol-Acetonitryl Ethanol-Acetonitrile	$1,64\cdot 10^{-2}$	2,4	-0,33	42	74
Etanol-Aceton Ethanol-Acetone	0	–	-0,23	0	–
Etanol-DMF Ethanol-DMF	0	–	-1,0	0	–

AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda, water 6%, EtOH-solvent 1:1 (v/v), $V_e=5\text{ cm}^3$, prot.alk. 1 mg, temp.30°C



Rys. 2. Rozdział AT (1) i ATEE (2) metodą HPLC.

Fig. 2. Resolution of AT (1) and ATEE (2) by HPLC method.

Analiza produktów reakcji

Opracowana metoda analizy HPLC umożliwia w ciągu 4 minut jednoczesne oznaczenie ATEE i AT w mieszaninie reakcyjnej z pominięciem oddzielnego wydzielania produktu reakcji.

Podsumowanie

Badano syntezę estru N-Ac-L-Tyr z udziałem natywnej oraz immobilizowanej serynowej proteinazy alkalostabilnej PB92 w środowisku alkoholu etylowego o zawartości wody od 0 do 25%. Uzyskane wyniki potwierdziły duży wpływ wody na aktywność katalityczną enzymu. Wykazano, że dla natywnego enzymu, 6% wody w układzie stwarza optymalne warunki, w których reakcja przebiega z największą szybkością początkową, $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, z wydajnością 96% (po 48 godzinach reakcji). Jednak immobilizowana proteinaza wykazywała generalnie wyższą aktywność i stabilność w porównaniu z jej natywną formą. Dlatego też preparat ten został wybrany do przyszłych badań kinetycznych w układach niektórych rozpuszczalników hydrofilowych oraz hydrofobowych. Reakcję estryfikacji N-Ac-L-Tyr katalizowaną przez natywną proteinazę przeprowadzono również w układach hydrofilowych solwentów: EtOH-acetonitryl// -aceton// -DMF. Synteza nie przebiegała w obecności acetonu oraz dime-tyloformamidu. Stwierdzono, że ich niekorzystny wpływ na katalizę reakcji może być spowodowany deformacją warstwy wody niezbędnej do stabilizowania konformacji biokatalizatora.

LITERATURA

- [1] Brink L.E.S. i in.: Biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 1988, 736.
- [2] Chen L.F, Tsao G.T.: Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads, *Biotechn. and Bioeng.*, **19**, 1977, 1463.
- [3] Griebenow K., Klibanov A.M.: Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carlsberg in organic solvents? *Biotechn. and Bioeng.*, **53**, 1997, 351.
- [4] Davis N.C., Smith E.L.: *Methods of Biochemical Analysis* (2 ed. by D. Glick) New York 1985, 215.
- [5] Halling P.J.: Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: Predictions of effects on equilibrium position, *Biotechn. and Bioeng.*, **35**, 1990, 691.
- [6] Ingalls R.G i in.: Reversal of enzymatic hydrolysis: rate and extent of ester synthesis as catalyzed by chymotrypsin and subtilisin Carlsberg at low water concentrations. *Biotechn. and Bioeng.*, **17**, 1975, 1627.
- [7] Khmelnitsky YU.L. i in.: Engineering biocatalytic systems in organic media with low water concentration, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 1988, 710.

- [8] Kirimura J.R i in.: The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs, *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 1969, 689.
- [9] Kise H., Shirato H.: Enzymatic reactions in aqueous-organic media.v. Medium effect on the esterification of aromatic amino acids by α -chymotrypsin, *Enzyme Microb.Technol.*, **10**, 1988, 582.
- [10] Kise H., Hayakawa, A.: Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their Catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents, *Enzyme Microb.Technol.*, **13**, 1991, 584.
- [11] Klibanov A.M.: Enzymes that work in organic solvents, *Chemtech*, 1986, 354.
- [12] Klibanov A.M.: Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Tibtech*, **15**, 1997, 97.
- [13] Kłyszajko-Stefanowicz L.: *Cytobiochemia*, PWN Warszawa, 1995, 65.
- [14] Kui Xu, Griebenow K.: Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents, *Biotechn. and Bioeng.*, **56**, 1997, 485.
- [15] Laane C i in.: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechn. and Bioeng.*,**30**, 1987, 81.
- [16] Lowry O.H., Rosenborough N.J., Farr A.L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 1951, 265.
- [17] Lozano P., Diego T., Iborra J.L.: Effect of water-miscible aprotic solvents on kyotorphin synthesis catalyzed by immobilized α -chymotrypsin, *Biotechnology letters*,**17**, 1995, 603.
- [18] Martin J.R. i in.: The solution structure of serine protease PB92 from *B.alcalophilus* presents a rigid fold with a flexible substrate-binding site, *Structure*, **5**, 1997, 521.
- [19] Zaks A., Klibanov A.M.: The effect of water on enzyme action in organic media, **263**, 1988, 8017.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF N-ACETYL-L-TYROSINE ETHYL ESTER IN ORGANIC MEDIA

S u m m a r y

The esterification of N-acetyl-L-tyrosine catalysed by native and immobilized on porous glass high-alkaline proteinase from *B. alcalophilus* PB92 in ethanol was studied. It was observed that native proteinase catalysed synthesis of N-Ac-L-Tyr ethyl ester (ATEE) in environment of 6% water concentration with initial rate $2.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1}$. However immobilized proteinase showed higher activity and stability comparing with her native form. Catalytic activity in cosolvent systems (water concentration 6%) : ethanol-acetone// -acetonitrile// -DMF 1:1 (v/v) was also investigated. Synthesis of ATEE in the presence of acetone and acetonitrile wasn't observed. ☒