

Nowe tendencje w technologii enzymatycznej transformacji węglowodanów*

Alicja Buchowiecka, Stanisław Bielecki
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka
ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź

Słowa kluczowe: biotechnologia przemysłowa, enzymatyczna transformacja węglowodanów, bioinżynieria enzymów, ekstremozymy

Wprowadzenie

Węglowodany – będące podstawowym źródłem energii dla wszystkich organizmów heterotroficznych – należą do najliczniej reprezentowanej grupy związków tworzących materię organiczną naszej biosfery. Przyjmują one bardzo zróżnicowane formy molekularne począwszy od relatywnie prostych struktur monosacharydowych, aż po rozgałęzione heteropolisacharydowe połączenia. Regio- i stereochemia tworzenia wiązań glikozydowych stwarzają teoretycznie nieograniczoną liczbę możliwych kombinacji strukturalnych, z których jednak tylko część jest obserwowana w naturze. Enzymatyczne procesy syntezy, modyfikacji i przemian, jakim podlegają węglowodany występujące *in vivo* zarówno w postaci wolnej jak i tzw. glikokonjugatów, nie są jeszcze w pełni poznane. Dynamicznie rozwijająca się współczesna glikobiologia systematycznie dostarcza nowej wiedzy na temat struktury i biologicznej roli tych substancji, stymulując jednocześnie rozwój dziedzin pochodnych jak medycyna, farmakologia, glikobiotechnologia czy biotechnologia żywności.

Nowa klasyfikacja enzymów modyfikujących węglowodany

W 1961 roku Komisja Enzymowa Międzynarodowej Unii Biochemicznej za twierdziła obowiązującą do dziś klasyfikację EC, która za podstawę przyjęła racjonalny podział enzymów wynikający z ich specyficzności względem katalizowanej reakcji, jak też ze specyficzności substratowej białka katalitycznego. Zgodnie z tym

* Jest to tekst wystąpienia zaprezentowanego na konferencji pt. „Biotechnologia w produkcji żywności” zorganizowanej przez Komitet Nauk o Żywności PAN 26 października 2005 r. w Warszawie.

kanonem najogólniej mówiąc enzymy syntetyzujące wiązania glikozydowe zaliczane są do klasy transferaz (EC 2.4.x.y), natomiast enzymy degradujące wiązania glikozydowe do klasy hydrolaz (EC 3.2.x.y) i liaz (EC 4.2.2.y).

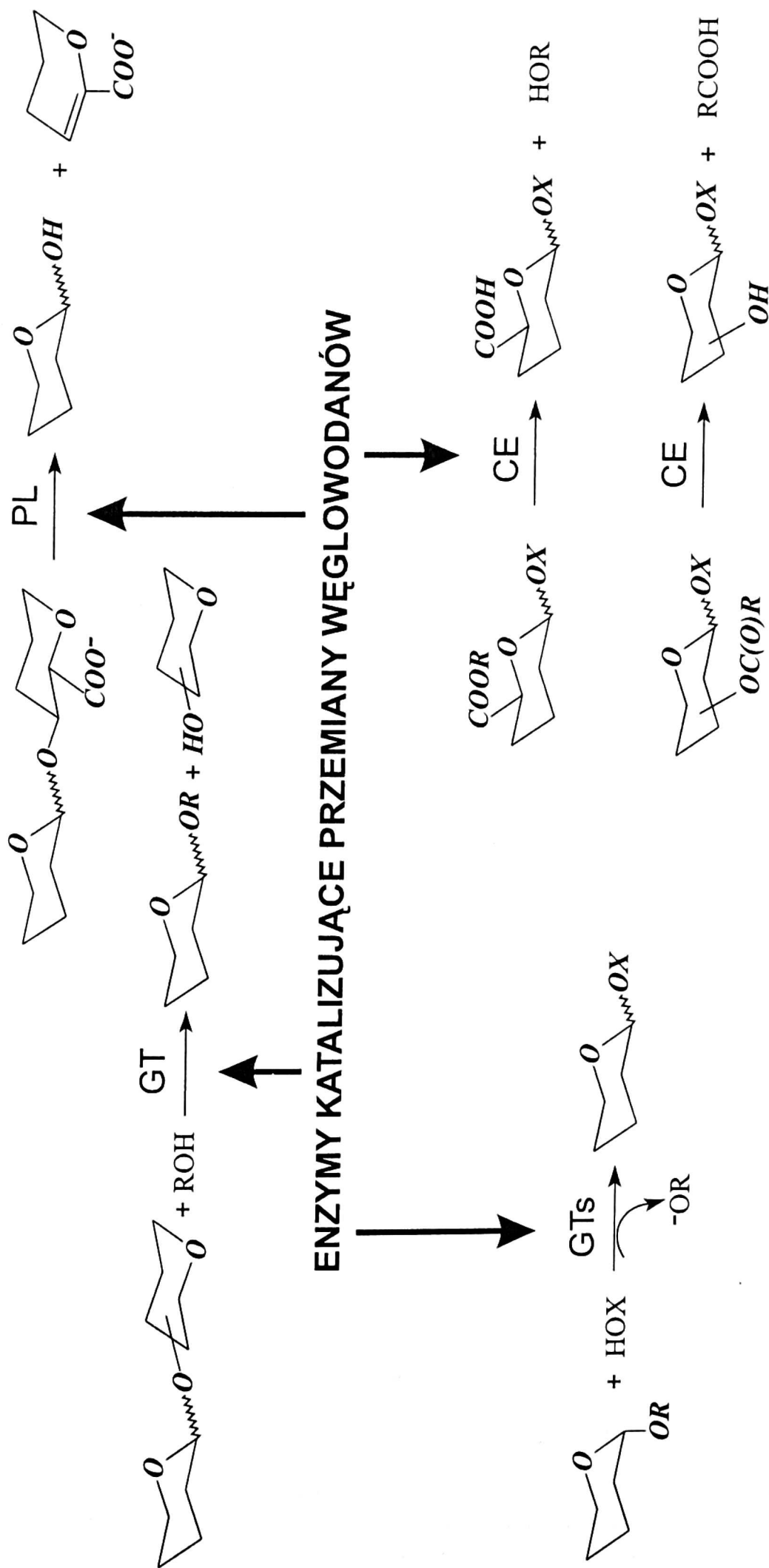
Postęp wiedzy w dziedzinie enzymologii wykazał, że obowiązująca systematyka enzymów często jest niewystarczająca do jednoznacznego zaklasyfikowania niektórych białek katalitycznych. Doświadczenia wykazały na przykład, że wiele glukanohydrolaz wykazuje zdolność do syntezy wiązania glikozydowego na drodze transglikozylacji, a niektóre transferazy mogą hydrolizować utworzone wiązanie glikozydowe. Eksperymentalnie dowiedzione zostały także odstępstwa od reguły specyficzności substratowej wśród enzymów depolimeryzujących skrobię. W konsekwencji wieloletnich wysiłków świata nauki zdołano zaproponować i opracować osobną systematykę dla enzymów aktywnych w stosunku do węglowodanów. Powstała tzw. klasyfikacja CAZY (Carbohydrate Active Enzymes), która współlistnieje z tradycyjną klasyfikacją EC. Nieodpłatny dostęp do bazy danych CAZyModO, gromadzącej pełną i systematycznie uzupełnianą informację na ten temat, znajduje się na stronie internetowej <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>. W tym miejscu zostaną wyszczególnione jedynie główne założenia oraz zarys przyjętego porządku.

Klasyfikacja CAZY:

- wyodrębnia rodziny spokrewnionych strukturalnie modułów wiążących i modułów katalitycznych wśród enzymów, które degradują, modyfikują lub tworzą wiązania glikozydowe;
- uwzględnia podobieństwa sekwencji aminokwasów i mechanizmu katalizy;
- wyodrębnia klany rodzin o tym samym typie sfałdowania, mechanizmie katalizy i resztach katalitycznych.

Wyszczególnione zostały następujące klasy enzymów:

- Hydrolazy glikozydowe – **GHs** (Glycoside Hydrolases) (EC 3.2.1.x) obejmujące glikozydazy i transglikozydazy, które transformują wiązanie o konfiguracji (α - lub β -) wg mechanizmu katalizy z zachowaniem (*z*) lub inwersją (*i*) konfiguracji anomerycznej; podzielono je na cztery grupy (α -*z*; α -*i*; β -*z*; β -*i*), które aktualnie zgromadzone są w 97 rodzinach.
- Glikozylotransferazy – **GTs** (Glycosyltransferases), (EC 2.4.x.y.) podzielone na dwie grupy o mechanizmie syntezy wiązania glikozydowego z zachowaniem lub inwersją konfiguracji anomerycznej w stosunku do aksjalnej konfiguracji nukleotydowego donora; aktualnie GT są zgrupowane w 75 rodzinach.
- Lizy polisacharydowe – **PLs** (Polysaccharide Lyases), (EC 4.2.2.x.) degradują wiązania glikozydowe na drodze β -eliminacji prowadząc do powstawania nienasyconych cukrów lub cyklicznych anhydrocukrów; aktualnie PLs są zgrupowane w 15 rodzinach.
- Esterazy węglowodanów – **CEs** (Carbohydrate Esterases) katalizują deacetylację *O*- i *N*-podstawionych sacharydów według zróżnicowanych mechanizmów; aktualnie CEs są zgrupowane w 14 rodzinach.



Rysunek 1. Przykłady reakcji chemicznych katalizowanych przez hydrolazy glikozydowe (GT), glikozylotransferazy (GTs), Lizy polisacharydowe (PL) oraz esterazy węglowodanowe (CE) [6]†
 GT: w reakcjach hydrolizy $\text{ROH} = \text{H}_2\text{O}$; w reakcjach transglikozytacji nukleofil $\text{ROH} \neq \text{H}_2\text{O}$
 GTs: do syntezy wiązania glikozydowego wykorzystują aktywne donory; grupą aktywną R jest zwykle nukleotyd lub fosforany lipid.
 PL: β -eliminacja; CE: przykłady de-O-acetylacji pochodnych cukrowych

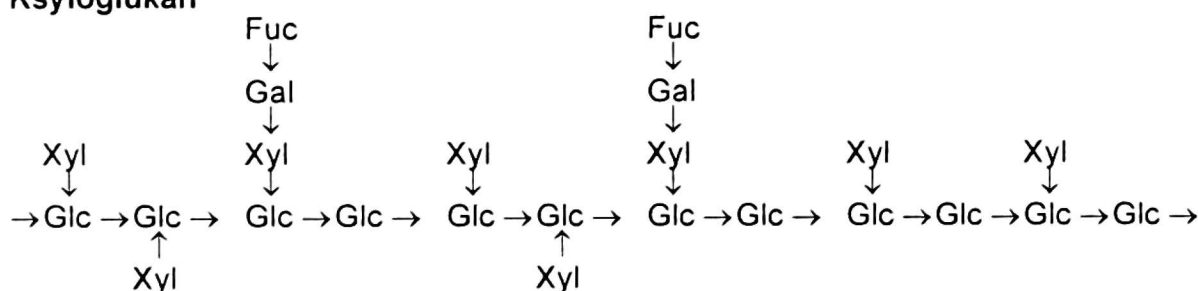
— Moduły wiążące węglowodany – CBMs (Carbohydrate Binding Modules).

Przykłady reakcji chemicznych katalizowanych przez wymienione klasy enzymów przedstawiono na rysunku 1 [6]. Mechanizmy tych reakcji zostały niedawno opisane w zwięzłym artykule przeglądowym Withersa i Lairson [10].

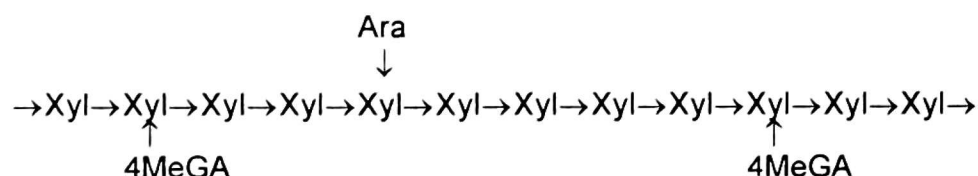
Przykłady strukturalnej różnorodności węglowodanów

Szacuje się, że węglowodany stanowią około 75% całej biomasy nagromadzonej na kuli ziemskiej, z czego połowa przypada na tzw. strukturalne polisacharydy, które budują ściany komórek roślinnych o wymaganej wytrzymałości i oporności na mikrobiologiczną degradację. Szkielet ścian komórek roślinnych tworzą mikrowłókna celulozy zbudowane z liniowego β -1,4-glukanu o uporządkowanej strukturze krystalicznej z wtrąceniami regionów amorficznych [2]. Mikrowłókna te połączone są ze sobą za pomocą lignin i siateczki polisacharydów znanych jako hemiceluloza. Składająca się z ksylanów, arabanów i mannanów hemiceluloza, w przeciwieństwie do celulozy, jest amorficzna i strukturalnie heterogeniczna, tj. zmodyfikowana w wyniku enzymatycznych procesów acetylowania i glikozylacji. Stopień i natura tych modyfikacji jest unikalna i taka sama w obrębie określonego gatunku. I tak np. ksylany tworzące hemicelulozy ziarna pszenicy zbudowane są z połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi reszt β -D-ksylopiranozy, które w pozycjach C2 i/lub C3

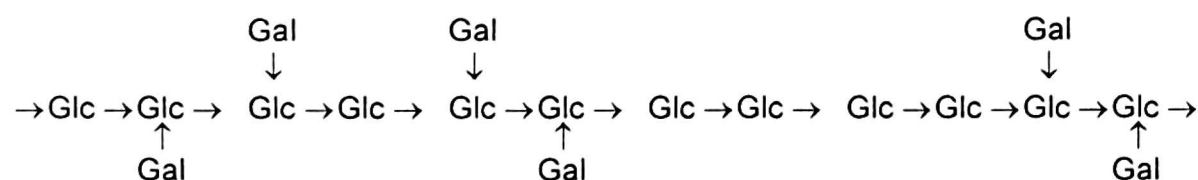
Ksyloglukan



Ksylan



Galaktomannan



Rysunek 2. Schematyczna reprezentacja struktur niektórych hemiceluloz [20].

Glc: D-glukoza; Gal: D-galaktoza; Man: D-mannoza; Xyl: D-ksyloza; Ara: L-arabinoza; Fuc: L-fukoza; 4MeGA: kwas 4-metylo-D-galakturonowy

mogą mieć reszty L-arabinofuranozy; ta z kolei, w pozycji C5, może ulegać estryfikacji tzw. kwasem ferulowym, tj. 4-hydroksy-3-metoksybenzoesowym. Niepodstawiony łańcuch ksylanu przyjmuje konformację elastycznej, lewoskrętnej helisy, z trzema resztami ksylozy na skręt [5]. Obecność cukrowych podstawników zaburza strukturę helisy wpływając jednocześnie na zdolność polimeru do wiązania wody.

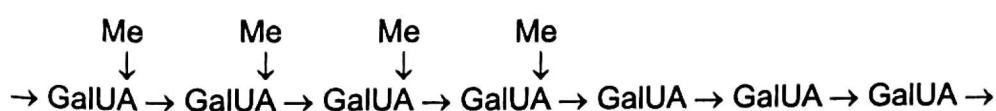
Równie rozległą i strukturalnie zróżnicowaną grupą heteropolisacharydów odpowiedzialnych za spójność tkanek roślinnych są pektyny, które najobficiej występują w owocach. Schematy przykładowych struktur niektórych hemiceluloz oraz domen strukturalnych substancji pektynowych przedstawiono na rysunkach 2 i 3.

Z kolei ziarna zbóż i roślin strączkowych, a także bulwy roślin okopowych są bogatym źródłem węglowodanów zapasowych będących homopolimerami α -D-glukozy (skrobia) oraz β -D-fruktozy. Wśród tych ostatnich, określanych jako fruktany wyróżnia się inulinę, neo-inulinę i lewan.

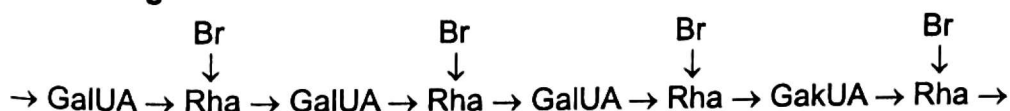
W stanie rodzimym skrobia występuje w postaci krystalicznej, tworząc ziarna, których wielkość i kształt zależą od źródła ich pochodzenia. Pod względem strukturalnym w skrobi można wyróżnić polimer liniowy o wiązaniach α -1,4-glikozydowych, zwany amylozą oraz polimer mający rozgałęzienia w pozycjach α -1,6-, określaną jako amylopektyna. Dla większości roślin frakcja amylozy stanowi od 15% do 30% składu skrobi. Interesującym wyjątkiem jest skrobia kukurydziana zawierająca tylko 2% amylozy i aż 98% amylopektyny.

Jednym z najprostszych strukturalnie fruktanów jest inulina. Ma ona łańcuch β -2,1-fruktozylowy przyłączony do fruktozylowej reszty sacharozy wiązaniem β -2-1-glikozydowym. Natomiast neo-inulina ma dodatkowy łańcuch β -2,1-fruktozylowy dołączony wiązaniem β -2,6-glikozydowym do reszty glukozyłowej disacharydu. W lewanie taki sam fruktozylowy łańcuch poprzez wiązanie β -2-6-glikozydowe łączy się z resztą fruktozylową sacharozy (rys. 4.).

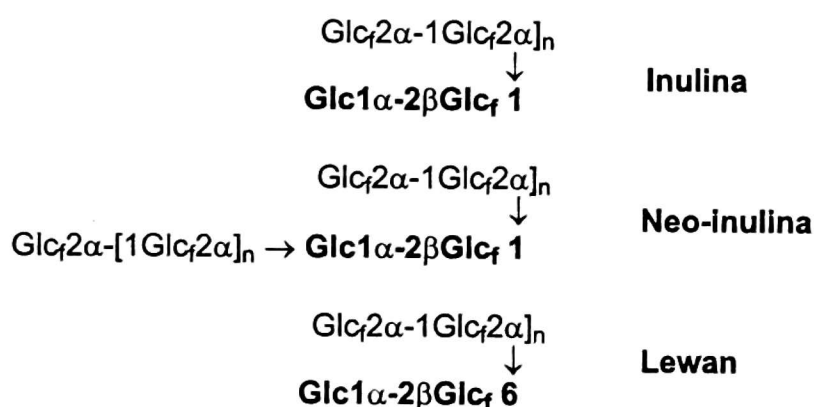
Homogalakturonian



Ramnogalakturonian I



Rysunek 3. Schematyczna reprezentacja struktur niektórych substancji pektynowych [5] **Homogalakturonian** z wiązaniem α -1,4-glikozydowymi w łańcuchu głównym. Niektóre z grup karboksylowych kwasu D-galakturonowego występują w postaci estrów metylowych; **Ramnogalakturonian I** z naprzemiennymi wiązaniami α -1,2 [GalUA \rightarrow Rha] oraz α -1,4- [Rha \rightarrow GalUA] w łańcuchu głównym; Br, oligo- bądź polisacharydowy łańcuch boczny tworzy rozgałęzienie z atomem C4 L-ramnozy



Rysunek 4. Przykłady różnych typów fruktanów: inulina; neo-inulina; lewan [21] – opis w tekście

Na skalę przemysłową inulina ekstrahowana jest z korzeni cykorii i rozdzielana metodami chromatografii jonowymiennej na frakcję zawierającą łańcuchy cukrowe o stopniu polimeryzacji $10 < DP < 60$ (tzw. *high performance inuline*) i frakcję niskocząsteczkową ($DP < 10$) [14].

Klasyczne biotechnologie bazujące na modyfikacji węglowodanów

Wymienione przykładowo polisacharydy roślinne powszechnie wykorzystywane są w żywieniu człowieka oraz jako pasza dla zwierząt. Są one także jednym z podstawowych surowców dla wielu innych technologii bazujących na enzymatycznej konwersji węglowodanów. Przykłady takich procesów prowadzonych na skalę przemysłową zebrano w tabeli 1.

W procesach prowadzonych na wielką skalę najpowszechniej stosuje się biokatalizatory pochodzenia drobnoustrojowego ze względu na relatywnie niskie koszty ich produkcji, dużą różnorodność oraz dostępność. Obecnie istnieje już potężny światowy rynek preparatów enzymatycznych, a ich producentami są tacy potentaci jak Novozymes A/S; DMS Baking Enzymes; DSM Food Specialities, Dairy Ingredients i in.

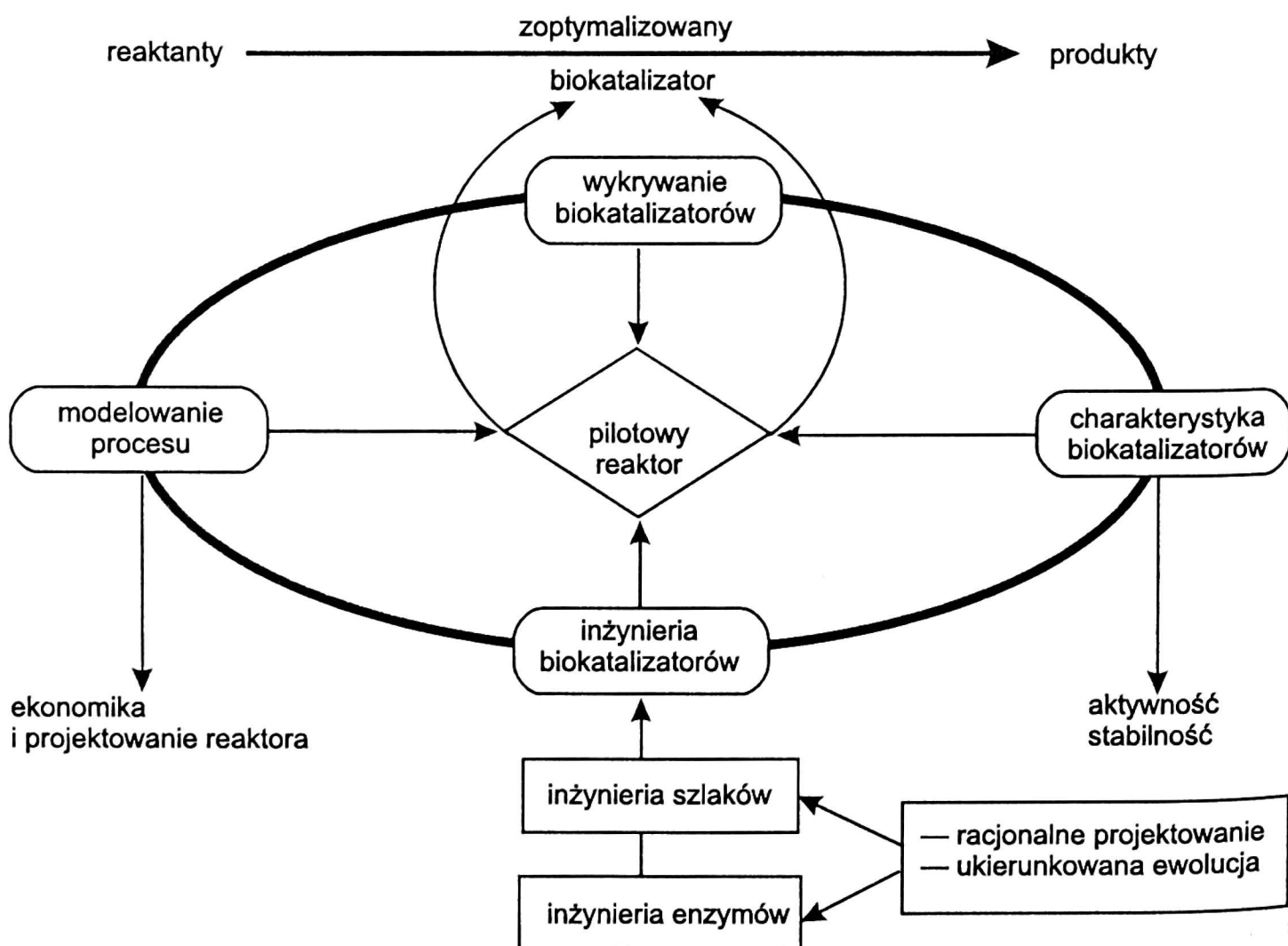
Warto podkreślić, że 75% enzymów przemysłowych stanowią hydrolazy, spośród których drugą pod względem liczebności grupę tworzą hydrolazy węglowodanów [4]. Są one wykorzystywane w wielu technologiach przetwórstwa żywności. Powszechnie znanymi przykładami są przemysłowe procesy biokonwersji skrobi, takie jak upłynnianie, scukrzanie czy izomeryzacja prowadzone z udziałem α -amylazy, β -amylazy, glukoamylazy, α -glukozydazy, izoamylazy, pululanazy typu I, II i III, izomerazy glukozywej czy CGTaza. Inną grupę preparatów o wysokim znaczeniu dla przetwórstwa owoców i warzyw czy też browarnictwa i biotechnologii wina stanowią tzw. enzymy macerujące, do których zaliczane są celulazy, hemicelulazy i pektynazy. Degradują one strukturalne polisacharydy obecne w tkankach roślinnych ułatwiając tym samym wydobywanie pożądaných składników z surowca, a obniżając lepkość otrzymywanych ekstraktów upraszczają poszczególne operacje jednostkowe w procesie technologicznym. Szczegółowe informacje na temat przemysłowych zastosowań konkretnych enzymów należących do tej grupy można znaleźć w obszernym artykule przeglądowym Bhata [4].

Tabela 1. Biokatalizatory aktywne w stosunku do węglowodanów powszechnie stosowane w różnych branżach przemysłu

Branża przemysłu	Biokatalizator	Zastosowanie
Skrobia i biopaliwa	amylaza	upłynnianie i scukrzanie skrobi
	amyloglukozydaza pululanaza izomeraza glukozowa glikozylotransferaza cyklodekstryn ksylanaza	scukrzanie skrobi scukrzanie skrobi przekształcanie glukozy do fruktozy produkcja cyklodekstryn redukcja lepkości zacierów
Przemysł spożywczy	laktaza	usuwanie laktozy (mleczarstwo)
	metryloesteraza pektynianowa pektynaza	utrwalanie produktów owocowych przemysł owocowy
Piekarnictwo	amylaza ksylanaza oksydaza glukozowa	obróbka mąki, regulacja struktury chleba kondycjonowanie ciasta wzmacnianie struktury ciasta
Produkcja napojów	pektynaza amylaza	usuwanie pektyn, klasyfikacja produkcja piwa niskokalorycznego, obróbka soków zacieranie dojrzewanie piwa
	β -glukanaza dekarboksylaza octanomleczanu lakkaza	klarowanie (soki), nadawanie odpowiednich walorów smakowych (piwo), obróbka korków do wina
Przemysł paszowy	ksylanaza β -glukanaza	poprawianie strawności pasz poprawianie strawności pasz
Przemysł tekstylny	celulaza amylaza liaza pektynianowa katalaza lakkaza	bioobróbka jeansu, zmiękczenie bawełny odklejanie klejunki skrobiowej obróbka wstępna surowych materiałów kończenie procesu bielenia bielenie
Detergenty (dla środków do prania i mycia)	amylaza	usuwanie zabrudzeń skrobiowych
	celulaza	czyszczenie, uzyskiwanie odpowiednich efektów barwnych, zapobieganie ponownemu osadzeniu się barwnika (bawełna)
	mannanaza	usuwanie zabrudzeń mannanowych
Przemysł celulozowo-papierniczy	amylaza	powlekanie skrobią, odbarwianie, poprawianie nasiąkliwości
	ksylanaza celulaza	poprawa charakterystyki procesu bielenia odbarwianie, poprawianie nasiąkliwości, modyfikacja włókien celulozy

Nowoczesne projektowanie przemysłowych procesów biokatalitycznych

Nowoczesne projektowanie przemysłowych procesów biokatalitycznych powinno odbywać się zgodnie z dobrze wypracowanym już modelem postępowania. W modelu takim wyróżnić można kilka podstawowych obszarów projektowo-badawczych bazujących na nowoczesnych technologiach. Wzajemne funkcjonalne związki między tymi obszarami prowadzące do uzyskania użytecznych biokatalizatorów ilustruje schemat na rysunku 5.



Rysunek 5. Nowoczesne projektowanie przemysłowych procesów biokatalitycznych [27]

Pozyskiwanie ulepszonych form biokatalizatorów

Podstawowym narzędziem w przemysłowych procesach nowej generacji jest biokatalizator, rozumiany bądź to jako natywne (rzadziej) lub modyfikowane (częściej) białko katalityczne, bądź też indywidualna natywna/modyfikowana komórka o określonych uzdolnieniach metabolicznych.

Tradycyjne biokatalityczne procesy przemysłowe opierają się głównie na pochodzących z mezofilnych mikroorganizmów preparatach enzymatycznych o parametrach operacyjnych często nie w pełni dostosowanych do warunków technologii.

Dlatego też dąży się do otrzymywania biokatalizatorów o właściwościach takich jak stabilność, aktywność, specyficzność substratowa czy enancjospiecificzność zoptymalizowanych pod kątem wymogów konkretnego procesu w ciągu technologicznym.

Cel ten realizuje się zarówno poprzez przesiewowe poszukiwanie nowych źródeł biokatalizatorów (tzw. screening), jak też generowanie „ulepszonych” form molekularnych znanych białek katalitycznych metodami inżynierii molekularnej.

Screening ekstremozymów. Od kilkunastu lat przedmiotem głębszego zainteresowania są ekstremofilne bakterie i organizmy *Archaea* (<http://archaea.ws>), które w zależności od warunków bytowania określane są jako halo-, acido-, alkalo- psychro-, termo-, barofile. Wytwarzają one enzymy aktywne w skrajnych warunkach zasolenia, pH, temperatury i ciśnienia, a unikalne właściwości takich białek sprawiają, że postrzegane są one jako atrakcyjne biokatalizatory przemysłowe. Największym zainteresowaniem cieszą się termo-/barozymy potrzebne dla przemian prowadzonych w wysokich temperaturach i przy podwyższonym ciśnieniu. Obecnie wiadomo już, że niektóre z poznanych organizmów termofilnych wytwarzają termostabilne enzymy aktywne wobec polisacharydowych substratów [3].

Większość z wyodrębnionych i scharakteryzowanych dotąd ekstremofili zaklasyfikowana została do takich rodzajów jak np. *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Sulfolobus*, *Pseudoalteromonas*, *Halobacterium* i innych. Z powodu ekonomicznej nieopłacalności hodowania organizmów ekstremofilnych w dużej skali, ekstremozymy otrzymuje się w postaci białek rekombinowanych w komórkach mezofilnych gospodarzy. Dokonano już wielu udanych zabiegów klonowania i ekspresji genów takich białek w różnych pro- i eukariotycznych systemach ekspresyjnych, jak *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* [22, 25]. Stwierdzono, że w większości przypadków białka termofili zachowują swą termostabilność, ulegają poprawnemu sfałdowaniu w niskiej temperaturze oraz są odporne na działanie proteolitów gospodarza. Ponadto, ekspresja termozymów w komórkach mezofili umożliwia ich łatwe wyodrębnianie poprzez termiczną denaturację białek balastowych.

Na tej drodze otrzymano już termoaktywne enzymy konwertujące skrobię (α -amylaza, pululanaza typu I, II, III, α -glukozydaza, CGTaza, trehalaza) o optimum aktywności w zakresie temperatur 90–130°C, termoaktywne celulazy (optimum działania 95–115°C), ksylanazy (80–110°C), a także nieliczne termostabilne enzymy hydrolizujące chitynę [15, 22, 25].

W związku z ogólnoświatowymi tendencjami zmierzającymi do ograniczenia konsumpcji energii elektrycznej rozwija się również zapotrzebowanie na tzw. „zimne enzymy” wywodzące się z organizmów psychrofilnych [7, 8]. Psychrozymy w temperaturach bliskich 0°C wykazują aktywność porównywalną do tej, jaką mają ich mezofilne homologi w temperaturze 37°C. Podobnie jak w przypadku termozymów, psychrozymy o znaczeniu przemysłowym wytwarza się stosując technologię rekombinowanego DNA. Klasycznym przykładem takiego białka katalitycznego może być β -galaktozydaza morskiej antarktycznej bakterii *Pseudoalteromonas* sp. 22b wyodrębniona w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Niedawno został

opublikowany obszerny artykuł na temat właściwości katalitycznych i molekularnych tego białka oraz możliwości jego praktycznego wykorzystania do obniżania zawartości laktozy w produktach spożywczych przeznaczonych dla osób z dysfunkcją β -galaktozydazy przewodu pokarmowego [24].

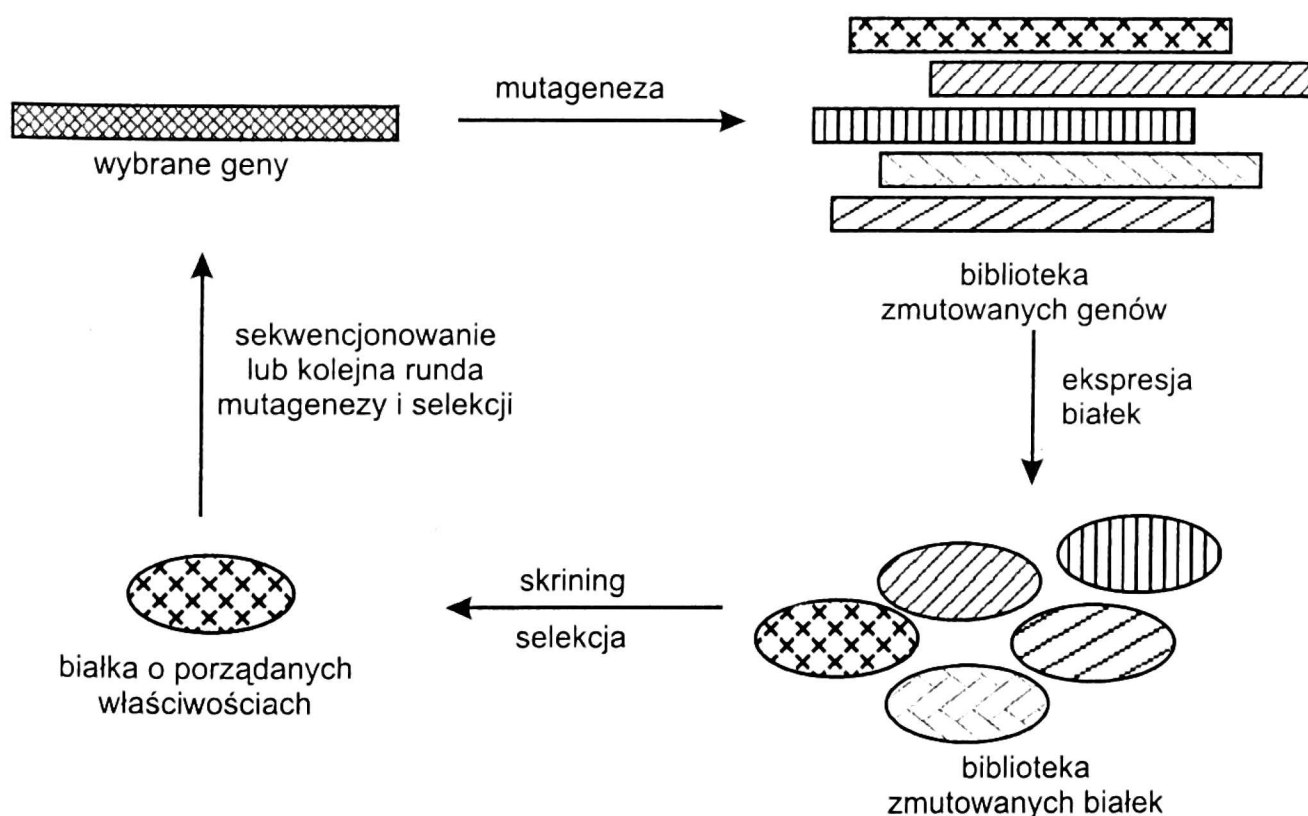
Molekularna inżynieria biokatalizatorów. Molekularna inżynieria biokatalizatorów ma na celu generowanie biokatalizatorów o sprecyzowanych właściwościach z przeznaczeniem do konkretnych zastosowań. Cel ten osiągany jest na drodze dwóch odmiennych, aczkolwiek wzajemnie stymulujących się strategii znanych jako racjonalne projektowanie oraz ukierunkowana ewolucja enzymów. Obie strategie posiadają się najnowszą interdyscyplinarną wiedzą oraz stosują najbardziej wyrafinowane i zaawansowane technologie.

Racjonalne projektowanie wykorzystuje metody mutacji punktowych do dokonania precyzyjnych zmian w sekwencji aminokwasów. Prace eksperymentalne poprzedzane są zwykle projektowaniem *in silico*, które umożliwia trafniejsze przewidywanie strukturalnych konsekwencji planowanych modyfikacji. Decyzja o delecji, insercji bądź wymianie odpowiednich aminokwasów podejmowana jest na podstawie szczegółowej wiedzy o strukturze białka, jego funkcji i mechanizmie działania. Zmiany kształtu molekuly w obszarach np. wiążących substrat czy kofaktor mogą wpływać na specyficzność enzymu; natomiast mutacje w kieszeni katalitycznej często prowadzą do zmiany mechanizmu reakcji bądź – w przypadku enzymów katalizujących więcej niż jedną transformację – do zmiany równowagi pomiędzy konkurencyjnymi reakcjami chemicznymi. Mutacje punktowe w innych obszarach cząsteczki mogą prowadzić nie tylko do zmian w sekwencji aminokwasów, ale często powodują zmiany w drugo- bądź w trzeciorzędowej strukturze białka modyfikując jego stabilność.

Tradycyjna metodyka wymaga potwierdzenia rezultatów mutacji najpierw przez sekwencjonowanie zmutowanego genu, a następnie wyodrębnienie i oczyszczenie jego produktu i ostatecznie określenie właściwości, kinetyki oraz funkcji „udoskonalonego” białka.

Ukierunkowana ewolucja enzymów nie wymaga wiedzy na temat struktury białka, które zamierzamy ulepszyć, lecz stosuje różnorodne techniki mutagenizacji *in vitro* i rekombinacji do tworzenia obszernych bibliotek wariantów określonego genu. Obecnie molekularną różnorodność kolekcji zmutowanych genów osiąga się najczęściej dzięki stosowaniu coraz bardziej dopracowanych metod tzw. tasowania genów (DNA shuffling). Biblioteka zmutowanych genów przekształcana jest w kolekcję zmutowanych białek, które następnie poddaje się wysokowydajnej selekcji (tzw. high-throughput screening) w kierunku poszukiwanej cechy. Właśnie ten etap cyklu, tj. dostępność czulej i efektywnej metody screeningu (selekcji), decyduje o rezultacie końcowym wielokrotnie powtarzanej procedury.

W obecnym stanie wiedzy podstawową trudność stanowi zaprojektowanie metody jednoczesnego testowania milionów wariantów molekuł białkowych, których funkcja nie jest znana. Istotą jest tu przypisanie konkretnemu produktowi genu jego



Rysunek 6. Schemat przedstawiający kluczowe etapy ukierunkowanej ewolucji enzymów [23]

sekwencji DNA – innymi słowy, chodzi o umiejętność zrealizowania połączenia między selekcjonowanym fenotypem i odpowiadającym mu genotypem.

Obszerniejszej wiedzy na temat najnowszych osiągnięć, a także wyzwań, przed jakimi stoi współczesna inżynieria molekularna dostarczają niedawne artykuły przeglądowe, z których zaczerpnięto powyższe informacje [1, 11].

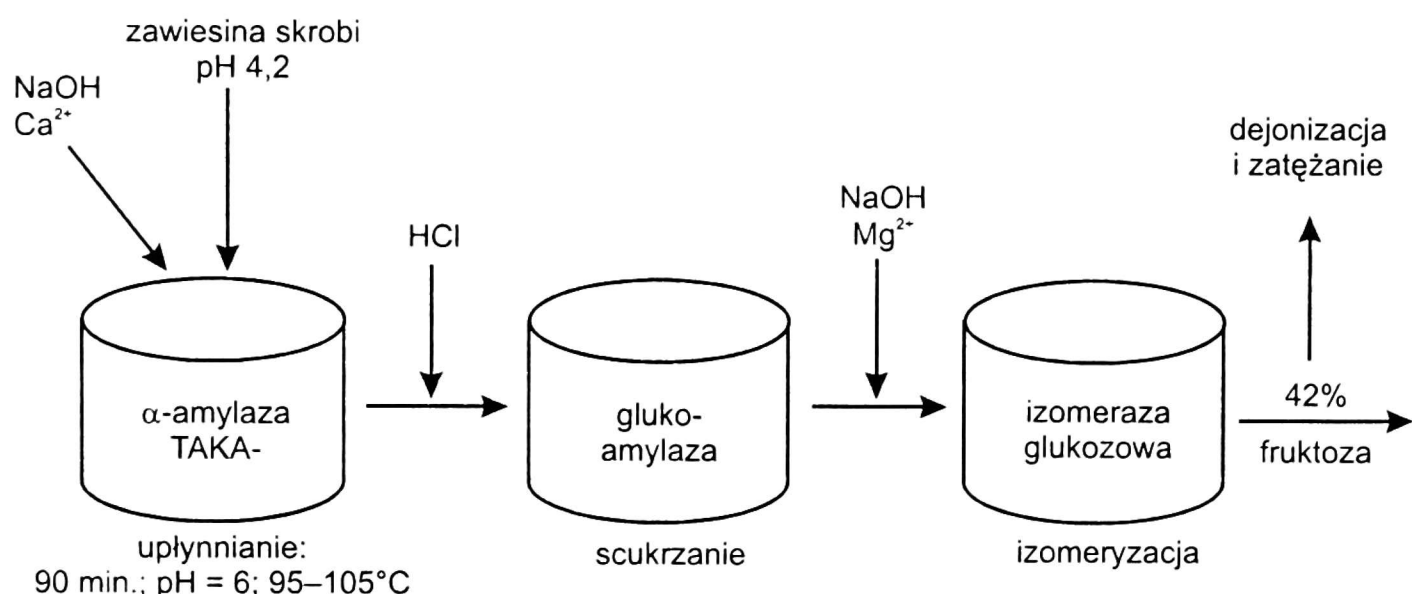
Zmutowane enzymy modyfikujące węglowodany

Przedstawione w zarysie strategie generowania nowych biokatalizatorów przemysłowych wywodzących się z organizmów *Archaea* zostały zastosowane najwcześniej dla procesów związanych z biotransformacją skrobi w glukozę i wysokofruktozowe syropy. Fakt ten wynika z ogromnego popytu przemysłu na produkty skrobiowe i tym samym z zapotrzebowania na termostabilne enzymy konwertujące skrobię.

Mutanty termozymów dla biokonwersji skrobi

W typowym procesie skrobia jest upłynniana do maltodekstrynowych syropów w temperaturze 95–100°C pod działaniem α -amylazy, a następnie w obniżonym pH konwertowana do glukozy przez glukoamylazę. Otrzymana glukoza jest poddawana izomeryzacji do 42% syropu fruktozowego, który po chromatograficznej dejonizacji dalej podlega zatężaniu do 52% stężenia końcowego (rys. 7).

Prowadzenie procesu izomeryzacji w temperaturze 90°C przesunęłoby równowagę chemiczną glukoza/fruktoza w kierunku wyższego stężenia fruktozy i umożli-



Rysunek 7. Schemat przemysłowej biokonwersji skrobi do mono- i oligosacharydów [26]

wiłoby omińnięcie etapu chromatograficznego. Z myślą o takim uproszczeniu procesu technologicznego dokonano skringu termo- i hipertermofilnych organizmów w kierunku izomerazy glukozowej. W rezultacie udało się wyizolować izomerazę ksylozo-glukozową TTXI z *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenae* oraz skonstruować jej dwa ulepszone warianty. Oczekiwanej zmiany preferencji substratowej enzymu w kierunku glukozy dokonano przez punktową wymianę waliny 138 na fenyloalaninę oraz waliny 185 na treoninę w miejscu wiążącym sacharyd. Natomiast mutacja TTXI, polegająca na zamianie glutaminy 58 na prolinę, spowodowała podniesienie stabilności termicznej molekuly przy jednoczesnym zachowaniu optimum temperaturowego dla jej katalitycznego działania [26].

Tabela 2. Efekty mutacji izomerazy ksylozo-glukozowej *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenae* w porównaniu z właściwościami enzymu natywnego oraz enzymu komercyjnego BLXI z *Bacillus licheniformis* [26]

Enzym	T _{opt.} [°C]	t _{1/2} w 85°C	Akt. wł./Glc w 85°C	Obszar mutacji
BLXI komercyjny	70	< 1 min.		
TTXI natywny	85	69 min.	13,57 J · mg ⁻¹	
TTXI Gln 58 Pro	85	99 min.		pętla-styk podjedn.
TTXI Val138Phe/Val185Thr			18,79 J · mg ⁻¹	miejsce wiążące substrat

Inne badania doprowadziły do wyizolowania i otrzymania w postaci białka rekombinowanego α-amylazy z *Pyrococcus furiosus*, której zmutowany wariant jest 3-krotnie bardziej aktywny i nie wymaga stabilizacji kationami wapnia. W porównaniu z powszechnie stosowaną α-amylazą *B. licheniformis* skonstruowany termozym wykazuje dwukrotnie wyższą aktywność i aż 13-krotnie wyższą stabilność w temperaturze 98°C. Wybrane właściwości biochemiczne obu enzymów zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Niektóre właściwości biochemiczne handlowego preparatu α -amylazy *B. licheniformis* i zmutowanej cząsteczki α -amylazy *P. furiosus* [26]

α -Amylaza	<i>B. licheniformis</i>	Mutant <i>P. furiosus</i>
M.cz. [kDa]	55,2	50,0
Akt. wł. w t = 98°C [J · mg]	2000	3900
pH opt.	7,0–8,0	5,5–6,0
Temp. opt. [°C]	90	100
Stabilizacja jonami Ca ²⁺	tak	nie
Czas półtrwania w t = 98°C	< 1 h	13 h bez Ca ²⁺
Dekstryny końcowe	G1–G6	G2–G7

Chociaż organizmy *Archeae* rzadko wytwarzają glukoamylazy, w 2002 r. udało się wyizolować termo- i acidofilne glukoamylazy z *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus*, *Picrophilus oshimae*. Otrzymane enzymy wykazują optimum aktywności w pH = 2 i w temperaturze 90°C, są stabilne w temperaturze 70°C w zakresie pH = 1–4, a inaktywacji ulegają w pH = 8. Te cechy sprawiają, iż mogą być one idealnymi biokatalizatorami procesu scukrzania upłynnionej skrobi, który zakończyć można przez prosty zabieg podniesienia pH środowiska.

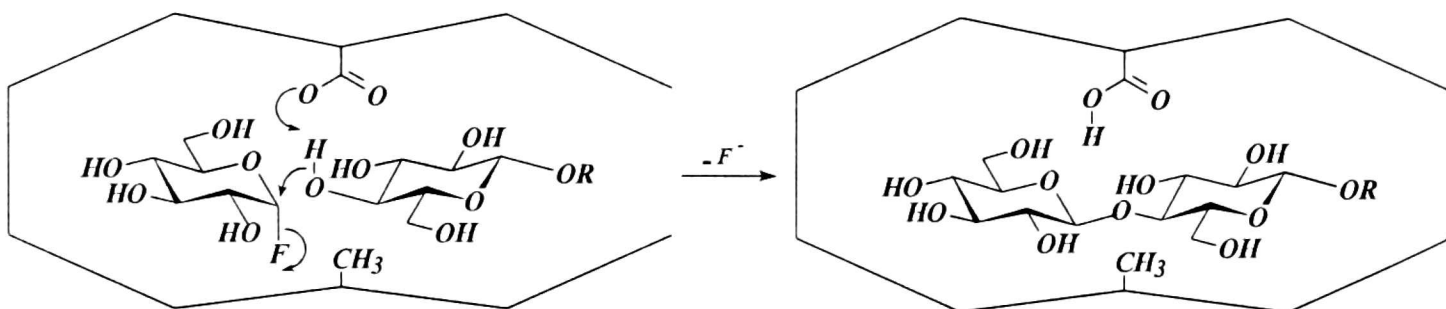
Przytoczone przykłady biokatalizatorów przemysłowych skonstruowanych dla uproszczenia konkretnych etapów biokonwersji skrobi dowodzą, że nowoczesne projektowanie przemysłowych procesów biokatalitycznych wkracza już w sferę praktyki [9].

Glikosyntazy – osiągnięcie bioinżynierii enzymów

Mówiąc o osiągnięciach bioinżynierii enzymów transformujących węglowodany nie sposób nie wspomnieć, o tzw. glikosyntazach. Są to specyficznie zmutowane glikozydazy, które katalizują wydajną syntezę oligosacharydów. Wywodzą się one z glikozydaz zachowujących anomeryczną konfigurację produktu. Enzymy te mają dwie katalityczne grupy karboksylowe pełniące odpowiednio funkcję kwasowo-zasadową oraz funkcję (wewnętrznego) nukleofila. Mutacja polega na wymianie katalitycznego nukleofila na resztę nienukleofilową (np. przez wprowadzenie alaniny), co prowadzi do unieczynnienia funkcji hydrolitycznej enzymu. Zmutowany enzym może przenosić donor będący fluorkiem glikozylowym o anomerycznej konfiguracji przeciwnej niż w naturalnym substracie, na odpowiedni akceptor.

Taka koncepcja modyfikacji centrum aktywnego glikozydaz po raz pierwszy opublikowana w 1998 roku została zaproponowana i zrealizowana przez zespół Withersa [12].

Obecnie opisanych jest już około kilkunastu tak zmutowanych enzymów [17]. W tabeli 4 przedstawiono przykłady niektórych z nich.



Rysunek 8. Pierwsza glikosyntaza Withers'a – specyficznie zmutowana (AbgGlu358Ala) β -glukozydaza/galaktozydaza z *Agrobacterium* sp. [12]

Tabela 4. Wybrane przykłady niektórych egzo-, endo- i tioglikosyntaz [17]

Organizm	Mutacja	Enzym	Produkty syntezy
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	E 387G	β -glikosyntaza (exo-syntaza)	di-, tri-, tetrasaccharydy
<i>Cellulomonas fimi</i>	E 519 S	β -mannosyntaza (exo-syntaza)	tri-, tetra-, penta-heksasacharyd
<i>Bacillus licheniformis</i>	E 134 A	β -glucansyntaza (endo-syntaza)	tri-, tetra-, pentasacharydy
<i>Cellvibrio japonicus</i>	E 320 G	β -Mannansyntaza (endo-syntaza)	tri- do hepta-sacharydy
<i>Agrobacterium</i> sp.	E 171 A	β -tioglukoligaza	disacharydy z wiązaniem tioglikozydowym
<i>C. fimi</i>	E 429 A	β -tiomannoligaza	disacharydy z wiązaniem tioglikozydowym

Skonstruowanie dużej liczby zmutowanych enzymów z klasy hydrolaz glikozydowych jest wynikiem zapotrzebowania na efektywne narzędzia do enzymatycznej syntezy oligosacharydów. Enzymatyczna synteza pozwala, bowiem ominąć główne bariery typowe dla syntezy chemicznej – konieczność stosowania grup ochronnych oraz częsty brak stereoselektywności reakcji glikozylacji. Oligosacharydowe produkty enzymatycznych transformacji wykazują różnorodne, korzystne właściwości biologiczne. Na przykład znajdują one zastosowanie jako istotne składniki tzw. żywności funkcjonalnej [16, 19] czy potencjalne terapeutyki [13, 18].

Podsumowanie

Artykuł w zwięzły sposób prezentuje główne kierunki postępu we współczesnej biotechnologii przemysłowej. Wprowadzenie zawiera przypomnienie podstawowych zasad nowej klasyfikacji enzymów aktywnych wobec węglowodanów, a także podaje przykłady zróżnicowania strukturalnego węglowodanów o znaczeniu przemysłowym. Zamieszczona jest również szeroka lista klasycznych procesów przemysłowych opartych na biotransformacji węglowodanów. Część druga, odnosząca się do kreowania wysoko zaawansowanych procesów biokatalitycznych, koncentruje się

głównie na projektowaniu i pozyskiwaniu nowych biokatalizatorów. W zwięzłej formie opisane są najnowsze kierunki skringu tzw. ekstremozymów oraz strategie molekularnej inżynierii biokatalizatorów, tj. racjonalne projektowanie i ukierunkowana ewolucja. W zakończeniu zaprezentowano niektóre osiągnięcia w tym zakresie, podając jako przykłady zmutowane termozymy modyfikujące skrobię, a także glikosyntazy.

Literatura

- [1] Aharoni A., Griffiths A.D., Tawfik D.S. 2005. High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9: 210–216.
- [2] Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 548–557.
- [3] Bertoldo C., Antranikian G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 151–160.
- [4] Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 355–383.
- [5] Courtin C.M., Delcour A.J. 2002. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J. Cereal Sci.* 35: 225–243.
- [6] Davies G.J., Gloster T.M., Henrissat B. 2005. Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 637–645.
- [7] Feller G., Gerday C. 1997. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.* 53: 830–841.
- [8] Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J-P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georlotte D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M-A., Feller G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *TIBTECH* 18: 103–107.
- [9] Haki G.D., Rakshit S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89: 17–34
- [10] Lairson L.L., Withers S.G. 2004. Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chem. Commun.* 2004: 2243–2248.
- [11] Lin H., Cornish V.W. 2002. Screening and selection methods for large-scale analysis of protein function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41(23): 4402–4425.
- [12] Mackenzie L.F., Wang Q., Warren R.A.J., Withers S.G. 1998. Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 5583.
- [13] McAuliffe J.C., Hindsgaul O. 1997. Carbohydrate drugs: an ongoing challenge. *Chem. Ind.* 5: 170–174.
- [14] Menne E., Guggenbuhl N., Roberfroid M.B. 2000. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. American Society of Nutritional Sciences: 1197–1199.
- [15] Niehaus F., Bertoldo C., Khler M., Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 711–729.
- [16] Ouwehand A.C., Derrien M., de Vos W., Tiihonen K., Rautonen N. 2005. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 212–217.
- [17] Perugino G., Tricone A., Rossi M., Moracci M. 2004. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol.* 22(1): 31–37.
- [18] Playne M.J. 2002. Glycoscience: oligosaccharide as drugs, functional food, and receptors in the gut. *Aust. Biotechnol.* 12: 35–37.

- [19] Rastall R.A., Maitin V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 490–496.
- [20] Reid J.S.G. 2000. Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesising enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 512–516.
- [21] Ritsema T., Smeeckens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 223–230.
- [22] Schiraldi Ch., Giuliano M., De Rosa M. 2002. Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea* 1: 75–86 (ARCHAEA ONLINE at <http://archaea.ws>)
- [23] Tao H., Cornish V.W. 2002. Milestones in directed enzymes evolution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 858–864.
- [24] Turkiewicz M., Białkowska A., Tkaczuk K., Kałużewska M., Makowski K., Cieśliński H., Wanarska M., Kur J., Bujnicki J.M. 2005. Antarktyczna β -galaktozydaza – właściwości i wykorzystanie w hydrolizie laktozy. W: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności, E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki (red.), Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie, Szczecin: 397–414.
- [25] van den Burg B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microb.* 6: 213–218.
- [26] Zeikus J.G., Savchenko A., Sriprapundh D., Vieille C. 1999. Bioengineering of amylase and xylose isomerase thermozymes. W: Recent advances in carbohydrate bioengineering. H.J. Gilbert, G.J. Davis, B. Henrissat and B. Svensson (red.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 107–113.
- [27] Zhao H., Chockalingam K., Chen Z. 2002. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 104–110.

New trends in technology of enzymatic transformation of the carbohydrates

Key words: industrial biotechnology, carbohydrate enzymatic transformation, enzyme bioengineering, extremozymes

Summary

The paper outlines the progress in current industrial biotechnology. The introductory part reminds the new classification bases of carbohydrate active enzymes and illustrates the structural diversity of carbohydrates of industrial importance. The broad list of classic technologies based on carbohydrate biotransformation was also given. The second part relating to creation of advanced biocatalytical processes is focused on designing and discovery of novel biocatalysts. The latest trends in both, screening for extremozymes and molecular bioengineering of enzymes, are briefly reported. The final section summarises some achievements in this field using mutated starch modifying thermozymes and glycosynthases as the examples.