



## Układy micelarne i mikroemulsje w katalizie enzymatycznej

Janina Rodakiewicz-Nowak

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni, Polska Akademia Nauk, Kraków

### Micellar and microemulsion systems in enzymatic catalysis

#### Summary

Micellar and microemulsion systems in aqueous and nonaqueous phases may be used as media for biocatalytic processes, both using enzymes and whole cells. In the paper, the interactions between surfactants and enzymes, basic rules of micellar and microemulsion enzymatic catalysis and some interesting results obtained in aqueous and nonaqueous systems are presented.

#### Key words:

biocatalysis, surfactants, micelles, microemulsions.

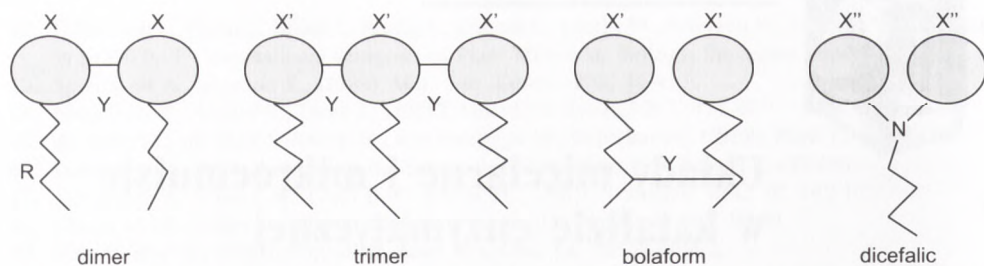
### 1. Wstęp

Surfaktanty to substancje powierzchniowo czynne, o amfifilowej strukturze cząsteczki, które gromadzą się preferencyjnie na wszelkich granicach międzyfazowych, obniżając napięcia międzyfazowe. Naturalne surfaktanty występują powszechnie w przyrodzie (lipidy, białka) i determinują powstawanie i właściwości błon biologicznych. Surfaktanty syntetyczne znajdują szerokie zastosowanie jako środki piorące, zwilżające, dyspergujące, pieniące, emulgujące, flotacyjne, ekstrakcyjne, itp.

Oprócz klasycznych, powszechnie znanych rodzajów prostych surfaktantów syntetyzuje się bardzo wiele nowych substancji powierzchniowo czynnych. Zapotrzebowanie na łatwo biodegradowalne związki powierzchniowo czynne, odnawialne, lub pochodzące ze źródeł odnawialnych, spowodowało wzrost zain-

#### Adres do korespondencji

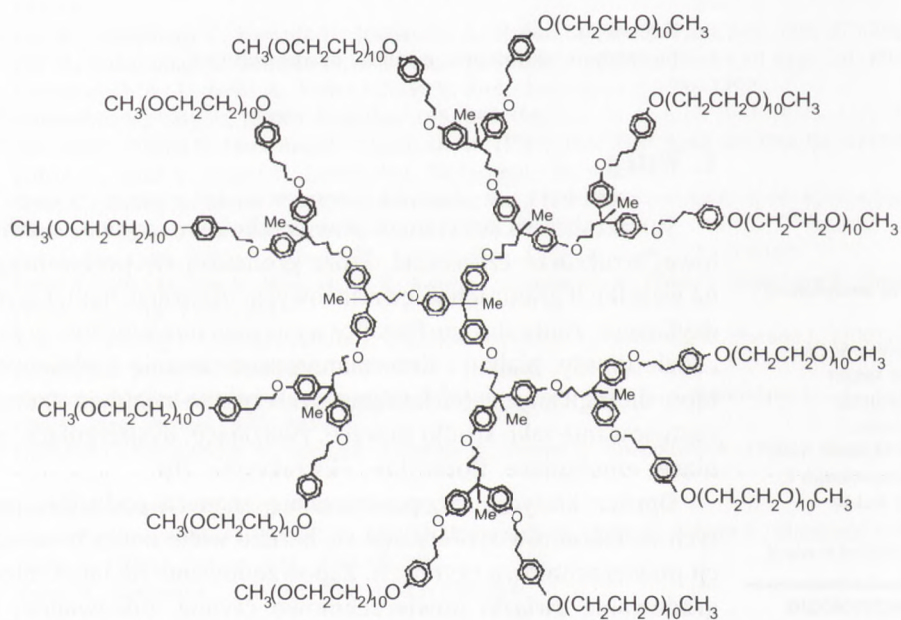
Janina  
Rodakiewicz-Nowak,  
Instytut Katalizy  
i Fizykochemii  
Powierzchni,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Niezapominajek 8,  
30-239 Kraków;  
e-mail:  
ncrodaki@cyf-kr.edu.pl



Rys. 1. Surfaktanty oligomeryczne: X:  $-N^+(CH_3)_2$ ,  $-PO_3$ ,  $-CHO(CH_3)_3SO_3$ ,  $-NHCOCHNHCH(NH_2)_2$ , X':  $-N^+(CH_3)_2$ , X'':  $-(CH_2)_3NH$ -glukoza,  $-(CH_2)_3NH$ -laktobioza, Y:  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_nO(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_nS(CH_2)_n-$ ,  $-\Phi-$ ,  $-\Phi-CH=CH-\Phi-$ , R: łańcuch alkilowy.

teresowania wytwarzaniem surfaktantów z naturalnych surowców, takich jak kwasy tłuszczowe, cukry i sterydy (1-3). Poszukiwanie nowych samoorganizujących się struktur doprowadziło do syntezy surfaktantów dimerycznych (gemini, bolaform, dicephalic) i trimerycznych (4,5) (rys. 1). Synteza surfaktantów o nowych funkcjach obejmuje wprowadzanie do ich cząsteczek peptydów, grup redokswych, fullerenów oraz grup zdolnych do polimeryzacji (6-9). Od niedawna syntetyzuje się także jednocząsteczkowe pseudomicelle (10-12) (rys. 2).

Powyżej określonego stężenia surfaktantu oddziaływania w obszarze „głów” surfaktantu prowadzą do minimum potencjału chemicznego dla ściśle zdefiniowa-



Rys. 2. Pseudomicela monomolekularna, z publikacji (10), za zgodą Wyd. Elsevier.

nej wartości powierzchni części polarnej przypadającej na jedną cząsteczkę substancji powierzchniowo czynnej. Wówczas zachodzi spontaniczny proces agregacji (micelizacji lub powstawania dwuwarstw). Powstające struktury są w pierwszym rzędzie zdefiniowane przez geometrię cząsteczki, tzn. stosunek powierzchni przekroju „głowy” do powierzchni przekroju części hydrofobowej surfaktantu (tab.), oraz przez czynniki zewnętrzne takie jak temperatura, obecność elektrolitu, dodatek kosurfaktantu, którymi można modyfikować rodzaj powstającej struktury i obszar jej występowania na diagramie fazowym (rys. 3, 4).

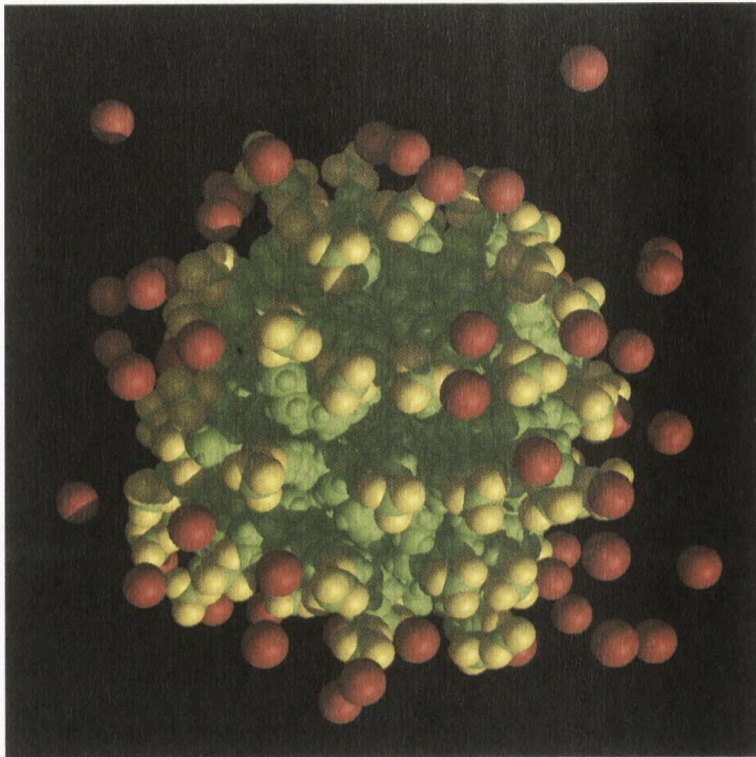
Tabela

## Wpływ geometrii cząsteczki surfaktantu na powstawanie różnych struktur

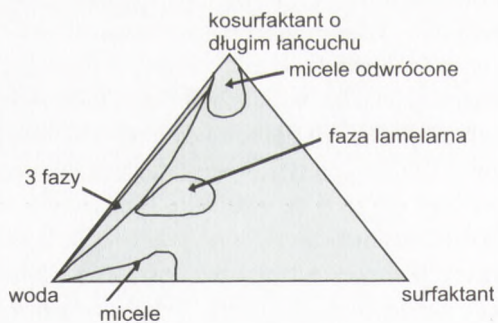
$V/(a_0 \cdot l)$	Struktura
$< 1/3$	micele sferyczne
$1/3, 1/2$	micele niesferyczne
$1/2, 1$	pęcherzyki lub dwuwarstwy
$> 1$	micele odwrócone

$V$  – objętość;  $a_0$  – powierzchnia głowy;  $l$  – długość części hydrofobowej cząsteczki surfaktantu.

Micele i mikroemulsje to termodynamicznie trwałe, izotropowe, dynamiczne (stałe dysocjacji monomerów rzędu  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) nanometrowe agregaty stabilizowane warstwą surfaktantu, o wysokiej powierzchni właściwej (rzędu  $100 \text{ m}^2 \text{ cm}^{-3}$ ). Micele i mikroemulsje różnią się przede wszystkim promieniem agregatów (do 20 nm w przypadku micel, i 20-200 nm w przypadku mikroemulsji). Micele właściwe tworzą cząsteczki surfaktantu zwrócone „głową” w stronę otaczającej agregaty wody, micle odwrócone tworzą cząsteczki agregatu zwrócone „głową” do wnętrza agregatów, a częścią hydrofobową w stronę fazy olejowej. Wnętrze micel i mikroemulsji typu o/w ma charakter hydrofobowy, zbliżony polarnością do węglowodorów, natomiast wnętrze micel odwróconych i mikroemulsji typu w/o wykazuje charakter polarny, zbliżony do metanolu. Właściwości wody zawartej we wnętrzu micel odwróconych zmieniają się w sposób ciągły wraz z wielkością agregatów, od wody związanej z membraną, o właściwościach analogicznych do wody związanej z membranami biologicznymi do wody o właściwościach wody objętościowej, w odległości większej niż 10 nm od powierzchni międzyfazowej. Stanowi to podstawę dla modelowania wpływu membrany biologicznej na strukturę i aktywność enzymów (13). W obszarze niskich stężeń surfaktantu micle przyjmują kształt nieregularny, ale bliski kuli, w zakresach wyższych stężeń lub w obecności elektrolitów kształt agregatów wydłuża się, zmieniając się od elipsy do pręta. Skład roztworu, temperatura i ciśnienie determinują powstawanie szeregu innych struktur (14), jednak w tych układach surfaktantowych rzadko prowadzi się procesy biokatalityczne.



Rys. 3. Micela siarczuanu dodecylosodowego (SDS), rys. A. Mckerella, wg obliczeń opublikowanych w: J. Phys. Chem., (1995), 99, 1846, za zgodą autora; zielona – część hydrofobowa; żółta – część polarna; czerwone – atomy sodu.



Rys. 4. Typowy uproszczony diagram fazowy, ilustrujący współistnienie roztworu micelarnego i mikroemulsji wody w oleju.

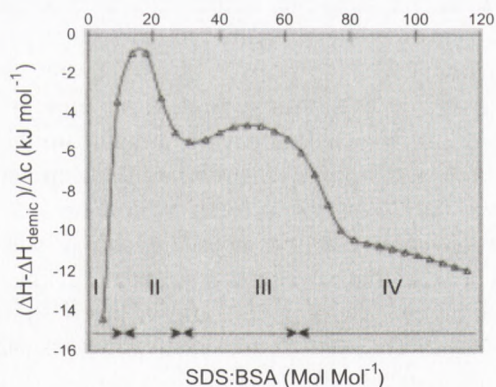
Zastosowanie układów micelarnych i mikroemulsyjnych w biokatalizie służy dyspergowaniu substratu i umożliwia konwersję substratu trudno rozpuszczanego w wodzie. Obecność fazy granicznej i cząsteczek surfaktantu powoduje aktywację niektórych enzymów (przede wszystkim enzymów membranowych), natomiast redukcja aktywności chemicznej wody lub ograniczenie stężenia wody powodują przesunięcie równowagi chemicznej reakcji enzymatycznych, stabilizację substratów lub produktów nietrwałych w środowisku wodnym lub zmianę selektywności reakcji enzymatycznej.

## 2. Oddziaływanie enzymów z surfaktantami

Surfaktanty mogą wpływać na stabilność cząsteczek enzymów i modyfikować ich aktywność katalityczną.

W obszarze dostatecznie niskich stężeń monomerycznego surfaktantu entropia mieszania surfaktantu przeważa nad siłami przyciągania pomiędzy cząsteczkami surfaktantu i białka i surfaktant nie wiąże się z białkiem. Powyżej pewnego stężenia monomerów, niezależnego od stężenia białka surfaktant silnie wiąże się z białkiem. W obszarze tym surfaktant może stabilizować strukturę białka, chroniąc je przed denaturacją termiczną lub chemiczną, lub nawet umożliwiając pofałdowanie częściowo zdenaturowanego białka (15,16). Po wysyceniu miejsc silnego wiązania surfaktant wiąże się z licznymi miejscami słabszego wiązania (17,18). Uważa się, że jest to wiązanie hydrofobowe. Wiązanie zachodzi w sposób kooperatywny, gdyż cząsteczki surfaktantu tworzą klastery podobne do micel na powierzchni białka.

Efekty te można zilustrować na przykładzie oddziaływań siarczany dodecylowo-sodowego (SDS) z albuminą bydlęcą (BSA) (rys. 5) (19). Monomery SDS (poniżej 0,7 mM SDS) wiążą się silnie z BSA, bez jej denaturacji lub agregacji, a wiązanie sur-



Rys. 5. Zależność zmiany entalpii molowej surfaktantu od składu roztworu (50 mM SDS + 0,5% w BSA) z publikacji D. Kelley i D. J. McClements (19), za zgodą Wyd. Elsevier.

faktantu zwiększa stabilność termiczną białka. Występują dwie różne klasy miejsc wiązania w zakresie niskich stężeń SDS: 3 miejsca silnego wiązania (elektrostatyczne i hydrofobowe) oraz 6 miejsc słabego wiązania (hydrofobowego). Stabilizacja termiczna BSA w bardzo niskich stężeniach surfaktantu wynika z faktu, że surfaktanty anionowe wiążą się silniej z białkiem natywnym niż zdenaturowanym (na powierzchni białka jest blisko położona grupa kationowa i domena hydrofobowa). W nieco wyższych stężeniach SDS, ale poniżej 2 mM surfaktant wiąże się kooperatywnie wywołując denaturację białka. Następuje redukcja stabilności termicznej, gdyż stan natywny wiąże mniej surfaktantu niż stan zdenaturowany. W zakresie od 2 do 5 mM SDS albumina jest już silnie rozfałdowana. Powyżej 5 mM SDS białko jest całkowicie zdenaturowane i wiąże 47 cząsteczek SDS na jedną molekułę. W stanie nasycenia białko owija się wokół trzech do czterech micel surfaktantu.

Kryształy fosfolipazy A otrzymywane w obecności niejonowego surfaktantu  $C_8E_4$  są otoczone pierścieniem cząsteczek surfaktantu, który łączy się w trójwymiarowej sieci całego kryształu (20).

Surfaktanty aktywują enzymy takie jak: lipazy i latentna postać tyrozynazy grzybowej (dzięki otwarciu dostępu do centrum aktywnego enzymu) (21,22), fosfolipaza C (uwalnianie diacyloglicerolu z centrum aktywnego) (23,24),  $\alpha$ -amylaza (zwiększenie powierzchni substratu dostępnej dla enzymu) (25) i dehydrogenaza alkoholowa z wątroby szczura (zmiany konformacyjne enzymu) (26). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że obecność surfaktantu pozwala na odpowiednie wzajemne usytuowanie lipazy i kolipazy (27). Symulacje komputerowe oddziaływań kwasów tłuszczowych i amin z lipazą *R. miehei* pokazują, że obecność tych surfaktantów zmienia fluktuacje cząsteczki białka także w częściach cząsteczki odległych od agregatu surfaktantowego (28).

Obecność surfaktantu lub granicy międzyfazowej jest niezbędna dla krystalizacji i rekonstrukcji białek membranowych (29). Generalnie jednak surfaktanty w roztworze wodnym, zwłaszcza w wyższych stężeniach dezaktywują lub denaturują enzymy, w stopniu zależnym od struktury cząsteczki surfaktantu i cząsteczki białka i trudnym do przewidzenia *a priori*. Helistoe (30) badał wpływ szeregu surfaktantów (Tween 20 (polioksyetylenowy laurynian sorbitolu), Tween 80 (polioksyetylenowy oleinian sorbitolu), Triton X-100 (polioksyetylenowy eter p-t-oktylofenylowy), deoksychofan sodu, CTAB (bromek heksadecylotrójmetyloamoniowy) i alkilobenzenu-sulfonian sodu) na aktywność lipaz z różnych mikroorganizmów (*C. viscosum*, *C. cylindracea*, *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *A. carneus*, *Penicillium* sp.). Stwierdził on, że ze względu na zmiany aktywności katalitycznej w obecności badanych surfaktantów lipazy eukariotyczne i prokariotyczne można potraktować jako dwie odmienne klasy, przy czym maksimum aktywności lipaz eukariotycznych występuje na ogół w stosunkowo wąskim zakresie niższych stężeń stosowanych surfaktantów.

Wpływ monomerów surfaktantów na strukturę i aktywność enzymatyczną w układach niepolarnych jest znacznie mniejszy niż w roztworach wodnych. Rozpuszczalność kompleksów białkowo-lipidowych w rozpuszczalnikach organicznych wykorzy-

stuje się od dawna w rekonstytucji enzymów membranowych. Obecnie wykorzystuje się też surfaktanty rozpuszczalne w środowisku niepolarnym takie, jak np. AOT (dwiizooktylosulfobursztynian sodu) do hydrofobizowania powierzchni enzymów hydrofilowych, co umożliwia ich dyspersję w rozpuszczalnikach niepolarnych (31,32).

Surfaktanty znajdujące się w warstwie międzyfazowej odwróconych micel i mikroemulsji w/o tworzą warstwę chroniącą cząsteczki enzymu przed negatywnym wpływem rozpuszczalnika organicznego. Wywierają one zdecydowany wpływ na strukturę i aktywność jedynie w przypadku enzymów membranowych i enzymów o ładunku przeciwnym do jonów surfaktantu, przyciąganych siłami elektrostatycznymi (33,34). Na strukturę pozostałych enzymów wywierają one mały wpływ (35), choć wzrost stężenia surfaktantu może redukować obserwowaną aktywność enzymatyczną.

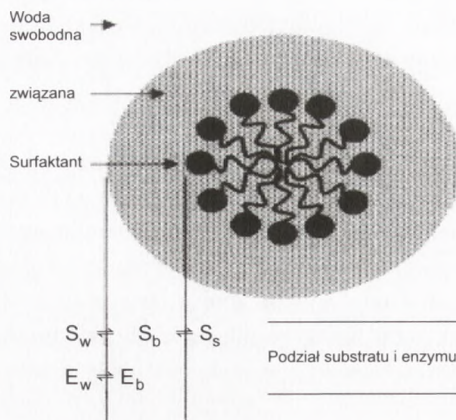
### 3. Biokataliza w wodnych roztworach surfaktantów

Kataliza micelarna reakcji nieenzymatycznych w wodnych roztworach surfaktantów pozwala na zmianę szybkości i drogi wszelkich reakcji chemicznych, dzięki skoncentrowaniu reagentów w małej objętości micel lub przy ich powierzchni, dzięki stabilizacji substratów, produktów przejściowych reakcji lub jej produktów, dzięki odpowiedniemu zorientowaniu substratów względem siebie, lub dzięki zmianie właściwości fizykochemicznych reagentów, lub też dzięki korzystnym współczynnikom podziału substratów i produktów reakcji (36). Przyspieszenia osiągnane w układach micelarnych mogą sięgać efektów katalitycznych reakcji enzymatycznych, dlatego często uważa się układy micelarne za układy biomimetyczne (37).

Natomiast efekty katalityczne środowiska micelnego, obserwowane w przypadku reakcji enzymatycznych są na ogół niewielkie. Znaczną aktywację uzyskuje się jedynie dla wzmiankowanych enzymów takich, jak lipazy, czy fosfolipazy, które wymagają obecności układu micelnego lub lipidowego (dwiwarstwy lub lipozomy) dla aktywowania enzymu, najczęściej przez otwarcie dostępu do centrum aktywnego enzymu (21,22). Inne enzymy, takie jak  $\alpha$ -chymotrypsyna, wykazują pewną superaktywność w środowisku micelnym (38,39).

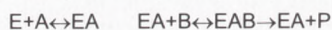
W opisie aktywności katalitycznej  $\alpha$ -chymotrypsyny zastosowano model pseudofazowy, zgodnie z którym substrat reakcji lokuje się w trzech pseudofazach (woda objętościowa, woda związana z cząsteczkami surfaktantu oraz wewnątrz miceli (cząsteczki surfaktantu), zgodnie z odpowiednimi współczynnikami podziału, a enzym lokuje się albo w fazie wodnej albo w wodzie związanej z cząsteczkami surfaktantu (40). Przyjęcie dla każdej z faz odpowiedniego równania kinetycznego (w tym przypadku równania Michaelisa-Menten) i uwzględnienie równowag podziału i bilansu masy pozwala na otrzymanie skorygowanych wartości szybkości reakcji hydrolizy substratów (rys. 6a). Aktywność izoenzymów chymotrypsyny z trzustki bydlęcej

a) Reakcja enzymatyczna zachodzi z podziałem enzymu i substratu pomiędzy wszystkie mikrofazy układu



$$V = \sum V_i$$

b) Reakcja dwuetapowa (reakcja zaadsorbowanej cząsteczki substratu i enzymu):



$$v = k \times [EAB] \times [A] \times [B] / (k_2 \times K_m + K_m \times [A] + [A] \times [B])$$

$[A] = [S] + [D]$  lub  $[A] = [S]$ , gdy enzym wiąże się specyficznie z micelą lub tylko z substratem w miceli.

Rys. 6. Opis kinetyki reakcji enzymatycznych w wodnych roztworach micelarnych: a) podział substratu i enzymu pomiędzy mikrofazy układu, b) wiązanie zaadsorbowanego substratu z enzymem.

( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  oraz  $\delta$ ) w roztworach micelarnych surfaktantów kationowych jest wyższa niż w roztworach micelarnych badanych surfaktantów niejonowych, rośnie wraz z rozmiarem „głowy” surfaktantu heksadecylo-alkilo-dwumetyloamoniowego (od pochodnej metylowej do propylowej) oraz w szeregu od  $\alpha$  do  $\gamma$  chymotrypsyny. Najwyższy stosunek aktywności w roztworze micelarnym do aktywności w roztworze wodnym wynosił 4,8 dla  $\gamma$ -chymotrypsyny, w reakcji utleniania p-nitroanilidu N-glutarylo-L-feniloalaniny w 3 mM roztworze bromku heksadecylo-dwumetylo-propylo-amoniowego.

Odmienne opis kinetyki reakcji przyjmuje się dla micelarnych roztworów lipaz (rys. 6b) (41). W modelu tym pierwszym etapem reakcji jest adsorpcja enzymu na granicy międzyfazowej, gdzie zachodzi reakcja opisywana równaniem Michaelisa-Menten, w którym stężenia reagentów i enzymu mają charakter stężeń powierzchniowych. Jeżeli powierzchniowe stężenie substratu nie zmienia się w wyniku reakcji, a cząsteczka enzymu pozostaje na powierzchni przez wiele cykli katalitycznych, odpowiada to modelowi nazwanemu *scooting mode*. Wówczas gdy enzym ulega szybkiej desorpcji z powierzchni przedstawiony model odpowiada modelowi *hooping mode*.

Roztwory micelarne surfaktantów niejonowych podnoszą efektywność procesów biokonwersji substratów trudno rozpuszczalnych w wodzie przy użyciu bakterii



i grzybów. Znakomitym przykładem jest enancjoselektywna dwuhydroksylacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez rekombinowany szczep *E. coli*, zawierający dwuoksygenazę naftalenową, w 35 mM roztworach Tritonu X-100 (z dodatkiem ok. 1% oleinianu metylu) (42). Uzyskano 100% konwersję naftalenu (10 mM) oraz 18% konwersję antracenu (1 mM). Utlenianie fenantrenu dawało dwa produkty, w stosunku 5:1, z wydajnością 41% (10 mM). Nie wymagający mieszanina zawiesiny naturalny transport reagentów w układach micelarnych przedłużał żywotność komórek bakterii w porównaniu z układami wielofazowymi. Dodatek surfaktantów niejonowych do płynu hodowlanego grzyba białej zgnilizny drewna *Bjerkandera* sp. BOS55 także znacznie podnosił wydajność procesu utleniania antracenu i benzo( $\alpha$ )pirenu do odpowiednich chinonów, podwyższając biodostępność substratu (43).

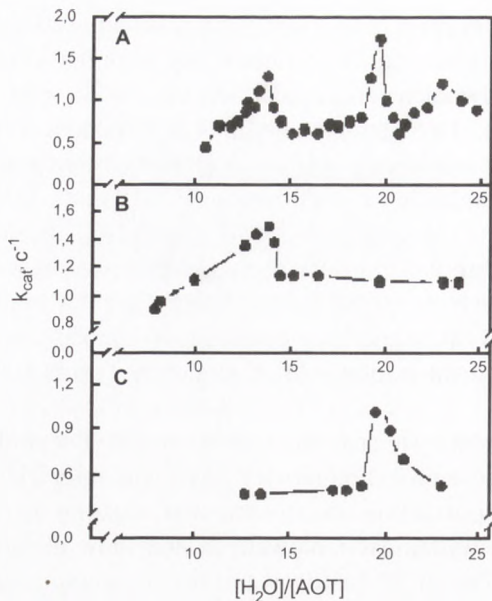
Niższe efekty uzyskuje się stosując izolowane enzymy w układach micelarnych, ponieważ do rozpuszczenia milimolarnych ilości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych potrzebne są stosunkowo stężone roztwory surfaktantów, w których trwałość i wydajność izolowanych enzymów ulegają znacznej redukcji. Micelarne roztwory Tween 20 zastosowano do konwersji różnych węglowodorów przy użyciu lakazy, uzyskując po 3 dobach 25-75% utlenianie antracenu (20  $\mu$ M) (44,45).

#### 4. Biokataliza w niewodnych roztworach surfaktantów

Od roku 1977, w którym Martinek zainicjował badania katalizy enzymatycznej w odwróconych micelach i mikroemulsjach wody w oleju (45) ukazało się bardzo wiele prac z tej dziedziny. Zbadano aktywność katalityczną niemal wszystkich dostępnych handlowo enzymów. Opublikowano też wiele prac poświęconych enzymom homogennie czystym. To rozróżnienie posiada istotne znaczenie w badaniach podstawowych, ponieważ stabilizatory, elektrolity czy też zanieczyszczenia organiczne zawarte w handlowych próbkach enzymów mogą znacząco zmieniać zarówno układ micelarny jak i wewnątrz micel czy mikroemulsji.

Ukazało się również wiele prac przeglądowych, zawierających tabele z odniesieniami do poszczególnych prac doświadczalnych z okresu poprzedzającego ukazanie się pracy (46-55). Dlatego omówione zostaną jedynie najbardziej zasadnicze czynniki determinujące efektywność procesów enzymatycznych w tym środowisku.

Agregaty micelarne najczęściej stosowanego surfaktantu anionowego (AOT, bis(2-etyloheksylosulfobursztynian sodu) przyjmują kształt niemal sferyczny i charakteryzują się stosunkowo wysoką monodispersyjnością. Promień wewnętrzny agregatów micelarnych rośnie liniowo wraz z wartością stosunku molowego wody do surfaktantu w roztworze. Wraz z promieniem zmienia się aktywność chemiczna, i stała dielektryczna wody. Pozwala to na kontrolowaną zmianę otoczenia enzymów. Na ogół aktywność enzymatyczna przyjmuje wartość maksymalną w agrega-



Rys. 7. Zależność aktywności katalitycznej acylazy penicylinowej od wartości  $w_0$ , w mikroemulsjach AOT w oktanie; A: roztwór natywnego enzymu; B: roztwór podjednostki  $\alpha$ ; C: roztwór podjednostki  $\beta$ ; z publikacji (57), za zgodą Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych.

tach o wielkości zbliżonej do promienia cząsteczki enzymu (13,56). Często jednak rośnie ona w całym zakresie możliwych do solubilizowania zawartości wody, a czasami pozostaje praktycznie stała po przekroczeniu pewnego promienia micel (24). Aktywność enzymów oligomerycznych w odwróconych micelach może wykazywać maksima w agregatach o wielkości odpowiadającej rozmiarom aktywnych oligomerów lub podjednostek enzymu (rys. 7) (57). Pokazano również, że glikozylacja lub deglikozylacja enzymów zmienia liczbę maksimów na krzywej zależności aktywności katalitycznej od promienia miceli, w związku z agregacją i dysocjacją enzymów i wynikającą stąd zmianą liczby aktywnych jednostek (58,59).

Odwrócone micelle i mikroemulsje wody w oleju są zdolne solubilizować we wnętrzu agregatów enzymy lub reagenty hydrofilowe. W tym przypadku transport reagentów do micel zawierających cząsteczkę enzymu odbywa się na drodze kolizji poszczególnych agregatów micelarnych (60,61). Z wyjątkiem bardzo szybkich reakcji enzymatycznych (katalaza lub anhidraza węglanowa) lub bardzo niskich stężeń substratów, szybkość reakcji enzymatycznych nie zależy od dynamiki układu, a większość reakcji enzymatycznych w środowisku micel odwróconych przebiega z szybkością podobnego rzędu jak w roztworach wodnych. W przypadku katalazy i peroksydazy chrzanu jest ona całkowicie zdeterminowana przez dynamikę układu i efektywnie wyższa niż w roztworach wodnych (62,63). W przypadku enzymów membranowych i substratów amfipatycznych lub niepolarnych lokalne stężenia substratu

we wnętrzu micel są niskie. Wzrost stężenia surfaktantu może poważnie redukować szybkość reakcji przebiegającej z udziałem substratów amfipatycznych, co opisuje się różnymi modelami podziału reagentów pomiędzy rozpuszczalnik, warstwę surfaktantu i wnętrza miceli (64-66) lub asocjacją substratu z micelą (24,67). Wynikiem różnic w rozpuszczalnościach i różnego podziału substratów pomiędzy mikrofazy obecne w roztworze jest przesunięcie krzywej zależności aktywności katalitycznej enzymu od hydrofobowości substratu (np. długości łańcucha węglowodorowego w szeregu homologicznym) w kierunku substratów bardziej hydrofilowych (68).

Generalnie obserwuje się także niewielkie przesunięcie zależności aktywności katalitycznej enzymu wzdłuż wartości pH. Ponadto niskie objętości i stężenia buforów solubilizowanych w agregatach micelarnych (rzędu od 25 do 50 mM) nie zawsze zapewniają odpowiednie buforowanie w przypadku substratów silnie kwasowych lub zasadowych (69).

Podobnie jak w wodnych roztworach micelarnych, również w odwróconych micelach zaobserwowano superaktywność enzymatyczną (50,55). Efekty są wyższe niż w roztworach wodnych, ale zwłaszcza te najwyższe – dyskusyjne, lub zależne od charakteru substratu.

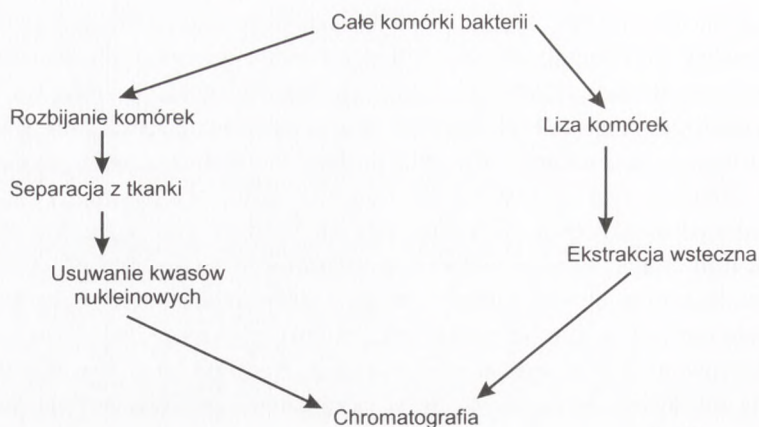
Analogicznie jak w roztworach niepolarnych rozpuszczalników organicznych, w niewodnych układach micelarnych, zwłaszcza o niskiej zawartości wody enzymy wykazują wzrost optymalnej temperatury aktywności katalitycznej oraz wzrost stabilności (53).

Enzymy lub białka silnie oddziałujące z warstwą surfaktantu mogą drastycznie wpływać na strukturę odwróconych micel (70).

Odwrócone micelle i mikroemulsje wody w oleju stabilizują enzymy halofilowe, umożliwiając prowadzenie konwersji substratów w stężeniach soli znacznie niższych niż w roztworach wodnych (71). Środowisko to można też wykorzystywać do reaturacji białek (72) oraz do wydzielania i oczyszczania białek (73-76). W tym ostatnim przypadku (rys. 8) zastosowanie układu micelnego zastępuje procesy rozbijania komórek, separacji materiału komórkowego i usuwania kwasów nukleinowych dwoma procesami: lizy komórek w układzie micelnym i selektywnej wstecznej ekstrakcji enzymu lub enzymów do roztworu wodnego, który następnie może być poddawany procesom chromatograficznym. Oba te procesy można prowadzić na skale przemysłową.

O ile w pierwszych latach polarne układy micelarne i mikroemulsyjne wykorzystywano przede wszystkim do modelowania przebiegu reakcji enzymatycznych, później rozpoczęto prace nad praktycznym wykorzystaniem enzymów w tych układach, a zatem nad separacją enzymów i produktów oraz możliwościami wielokrotnego wykorzystania enzymów. Zaproponowano ultrafiltrację poprzez membrany (77-79), wirowanie, organożele (80,81), utwardzane metodą zol-żel krzemionkowe organożele (82), czy też polimery z mikroemulsji typu w/o (83).

Wspomniano już, że testowano w odwróconych micelach zachowanie się praktycznie wszystkich dostępnych handlowo enzymów. Najwięcej uwagi poświęcono



Rys. 8. Schemat oczyszczania enzymów wewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem mikroemulsji w/o.

reakcjom enzymów hydrolitycznych, które w środowiskach o zredukowanej aktywności chemicznej wody katalizują reakcje syntezy peptydów, reakcje estryfikacji, czy też transestryfikacji (46-55) oraz procesom konwersji substratów trudno rozpuszczalnych w wodzie, jak np. steroidy (84). W mikroemulsjach wody w oleju można prowadzić proces polimeryzacji fenoli kontrolowanej przez właściwości układu (85,86), a ostatnio wykorzystano mikroemulsje wody w oleju do czyszczenia wełny i bawełny działaniem pektynazy (87).

Mikroemulsje wody w oleju zdolne są do solubilizacji różnych mikroorganizmów (drożdże, bakterie, grzyby, spory, a nawet komórki roślinne), z zachowaniem ich aktywności katalitycznej. Luisi wykazał, że komórki drożdży zachowują zdolność do oddychania w mikroemulsjach Tween 85 w alkoholu izopropylowym (88). Dowiedziono również żywotności komórek drożdży immobilizowanych w alginianie wapnia w mikroemulsjach AOT w izooktanie (89). Przykłady procesów katalizowanych przez komórki drożdży piekarskich immobilizowanych w mikroemulsjach wody w oleju podają Fadnavis i Desphande (55). Są to m.in. preparatywna redukcja  $\beta$ -ketoestrów do hydroksyestrów, ze zwiększoną enancjoselektywnością w stosunku do roztworów wodnych, enancjoselektywna hydroliza racemicznych pochodnych N-acetylowych alaniny, fenyloalaniny oraz estrów metylowych fenyloglicyny (>98% ee). Komórki *Mycobacterium* M156 katalizowały natomiast stereoselektywną epoksydację eteru alilowo-fenyloowego.

## 5. Wnioski

Oddziaływania monomerów surfaktantów, zwłaszcza surfaktantów jonowych z białkami są złożone i trudne do przewidzenia *á priori*. Natomiast wpływ agregatów micelarnych i mikroemulsyjnych na obserwowaną kinetykę reakcji katalitycznych

enzymów hydrofilowych można często opisać uwzględniając jedynie podział reagentów (enzym, substraty, produkty) pomiędzy fazę micelną (warstwa surfaktantu, wnętrze agregatu) a fazę ciągłą układu. Czasami obserwuje się jednak również aktywujący lub hamujący wpływ środowiska micelnego na aktywność katalityczną enzymu.

Układy micelarne i mikroemulsyjne stosuje się w przypadku konwersji substratów i produktów nietrwiałych lub trudno rozpuszczalnych w środowisku wodnym. Taką konwersję można też skutecznie prowadzić w mieszaninach wody z rozpuszczalnikami organicznymi lub w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych o kontrolowanej, niewielkiej zawartości wody (90,91), stosując enzymy immobilizowane na nośnikach, lub hydrofobizowane lipidami, surfaktantami lub innymi substancjami organicznymi dla uzyskania odpowiedniej rozpuszczalności w fazie organicznej. Jednak reakcje te przebiegają wolniej niż w układach micelarnych, a wiele enzymów ulega denaturacji. W tych przypadkach, tak jak w przypadku stosowania katalizy na całych komórkach układy micelarne mogą okazać się bardziej korzystne.

## Literatura

- Holmberg K., (2001), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6, 148-159.
- Stubenrauch C., (2001), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6, 160-170.
- Johansson I., Svensson M., (2001), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6, 178-188.
- Zana R., (2002), *Adv. Colloid Interface Sci.*, 97, 205-255.
- Wilk K. A., Syper L., Burczyk B., Sokołowski A., Domagalska B. W., (2000), *J. Surfactants Detergents.*, 3, 185-192.
- Piasecki A., (2003), *Surfactants and dispersed systems in theory and practice*, red. Wilk K. A., Oficyna Wyd. PWR., 61-68.
- Luk Y. Y., Abbott N. L., (2002), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 7, 267-275.
- Guyot A., (1996), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1, 580-585.
- Miller S. A., Ding J. H., Gin D. L., (1999), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 4, 338-347.
- Liu M., Kono K., Frechet J. M. J., (2000), *J. Controlled Release*, 65, 121-131.
- Liu H., Farrell, S., Uhrich K., (2000), *J. Controlled Release*, 68, 167-174.
- Torchilin V. P., (2001), *J. Controlled Release*, 73, 137-172.
- Khmel'nitsky, Yu.L., Kabanov A. V., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K., (1989), *Structure and Reactivity in Reverse Micelles*, Ed. Pileni M. P., Elsevier, Amsterdam, 230-261.
- Winter R., (2001), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 6, 303-312.
- Moriyama Y., Kawasaka Y., Takeda K., (2003), *J. Colloid Interface Sci.*, 257, 41-46.
- Marcozzi G., Di Domenico C., Spredi N., (1998), *Biotechnol. Progr.*, 14, 653-656.
- Savelli G., Spredi N., Di Profio P., (2000), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 5, 111-117.
- Rubingh D. N., (1996), *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1, 598-603.
- Kelley D., McClements D. J., (2003), *Food Hydrocolloids*, 17, 73-85.
- Snijder H. J., Timmins P. A., Kalk K. H., Dijkstra B. W., (2003), *J. Structural Biol.*, 141, 122-131.
- Heitz F., van Mau N., (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, 1597, 1-11.
- Derewenda U., Brzozowski A. M., Lawson D. M., Derewenda Z. S., (1992), *Biochemistry*, 31, 1532-1541.
- Espin J. C., Wichers H. J., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3503-3507.
- Rodakiewicz-Nowak J., Monkiewicz M., Haber J., (2002), *Colloids Surfaces A.*, 208, 347-356.
- Tanaka A., Hoshino E., (2002), *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 485-490.
- Hanozet G., Simonetta M., Barisio D., Querrito A., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, 196, 46-53.

27. Pignol D., Hermoso J., Kerfelec B., Crenon I., Chapus C., Fontecilla-Camps C. J., (1998), *Chem. Phys. Lipids*, 93, 123-129.
28. Peters G. H., (2002), *Colloids Surfaces B*, 26, 84-101.
29. Garavito R. M., Fergusson-Miller S., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 32403-32406.
30. Helistö P., Korpela T., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 113-117.
31. Goto M., Kamiya N., Miyata M., Nakashino F., (1994), *Biotechnol. Progr.*, 10, 263-268.
32. Okazaki S., Kamiya N., Goto M., (1997), *Biotechnol. Progr.*, 13, 551-556.
33. Vos K., Laane C., van Hoek A., Veeger C., Visser A. J. W. G., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 169, 275-282.
34. Steinmann B., Jäckle H., Luisi P. L., (1986), *Biopolymers*, 25, 1133-1156.
35. Barbaric S., Lusisi P. L., (1981), *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 4239-4244.
36. Fendler J. H., Fendler E. J., (1973), *Catalysis in Micellar and Macromolecular systems*, Acad. Press, New York.
37. Kunitake T., Shinkai S., (1980), *Adv. Phys. Org. Chem.*, 17, 435-487.
38. Spreti N., Alfani F., Cantarella M., D'Amico F., Germani R., Savelli G., (1999), *J. Molec. Catal. B*, 6, 99-110.
39. Viparelli P., Alfani F., Cantarella M., (2003), *J. Molec. Catal. B*, 21, 175-187.
40. Viparelli P., Alfani F., Cantarella M., (2001), *J. Molec. Catal. B*, 15, 1-8.
41. Panaiotov I., Ivanova M., Verger, R., (1997), *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.*, 2, 517-525.
42. Randazzo D., Berti D., Briganti F., Baglioni P., Scozzafava A., Di Gennaro P., Galli E., Bestetti G., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 74, 240-248.
43. Kottermann M. J. J., Rietberg H.-J., Hage A., Fidel J. A., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 220-227.
44. Johannes C., Majcherczyk A., Hüttermann A., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 313-317.
45. Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 335-341.
46. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Berezin I. V., (1977), *Dokl. Akad. Nauk ZSRR*, 236, 920-923.
47. Luisi P.L., Straub, B.E., (1984), *Reverse Micelles. Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structures in Apolar Media*, Plenum Press, New York.
48. Luisi P. L., Magid L. J., (1986), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 20, 409-475.
49. Luisi P. L., Giomini M., Pileni M. P., Robinson B. H., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, 947, 209-246.
50. Martinek K., Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmelnitsky Yu. L., Levashov A. V., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 981, 161-172.
51. Pileni M. P., (1989), *Structure and reactivity in reverse micelles*, Elsevier, Amsterdam.
52. Rodakiewicz-Nowak J., Steczko J., (1992), *Wiad. Chem.*, 46, 715-733.
53. De T. K., Maitra A., (1995), *Adv. Colloid Interface Sci.*, 59, 95-193.
54. de Gomez-Puyou T., Gomez-Puyou A., (1998), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 33, 53-89.
55. Fadnavis N. W., Desphande A., (2002), *Curr. Organic Chem.*, 6, 393-410.
56. Kabanov A. V., Levashov A. V., Klyachko N. L., Namyotkin S. N., Psheshetzky A. V., (1988), *J. Theor. Biol.*, 133, 327-343.
57. Kabakov A. V., Merker S., Klyachko N. L., Martinek K., Levashov A. V., (1992), *FEBS Letters*, 311, 209-212.
58. Levashov A. V., Rariy R. V., Martinek K., Klyachko N. L., (1993), *FEBS Letters*, 336, 385-388.
59. Kost O., Bovin N., Chemodanova E. E., Nasonov V. V., Orth T., (2000), *J. Molec. Recognition*, 13, 360-369.
60. Oldfield C., (1990), *Biochem. J.*, 272, 15-22.
61. Verhaert M. D., Hilhorst R., Vermüe M., Schaafsma T. J., Veeger C., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 187, 59-72.
62. Haber J., Maślakiewicz P., Rodakiewicz-Nowak J., Walde P., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 217, 567-573.
63. Gębicka L., Pawlak J., (1997), *J. Molec. Catal. B*, 185-192.
64. Khmelnitsky Yu. L., Neverova I., Polyakov V. I., Grinberg V. Ya., Levashov A. V., Martinek K., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 190, 155-159.
65. Bru R., Sanchez-Ferrer A., Garcia-Carmona F., (1990), *Biochem. J.*, 268, 679-684.
66. Perez-Gilabert M., Sanchez-Ferrer A., Garcia-Carmona F., (1992), *Biochem. J.*, 288, 1011-1015.

67. Aguilar F., Abiun E., Lissi E., (2001), Arch. Biochem. Biophys., 388, 231-236.
68. Martinek K., Khmel'nitsky Yu.L., Levashov A.V., Berezin I.V., (1982), Dokl. Akad. Nauk ZSRR, 263, 737-741.
69. Rodakiewicz-Nowak J., Maślakiewicz P., Haber J., (1996), Eur. J. Biochem., 238, 549-553.
70. Huruguen J. P., Pileni M. P., (1991), Eur. Biophys. J., 19, 103-107.
71. Marhuenda-Egea F., Bonete M. J., (2002), Curr. Opin. Biotechnol., 13, 385-389.
72. Hagen A. J., Hatton T. A., Wang D. I. C., (1990), Biotechnol. Bioeng., 35, 966-975.
73. Giovenco S., Verheggen F., Laane C., (1987), Enzyme Microb. Technol., 9, 470-473.
74. Hatton T. A., (1989), *Surfactant – based separation processes*, Eds. Scamehorn J. F., Harwell J. H., M. Dekker, New York, 56-90.
75. Pires M. J., Aires-Barros M. R., Cabral J. M. S., (1996), Biotechnol. Progr., 12, 290-301.
76. Naoe K., Nishino M., Ohsa T., Kawagoe M., Imai M., (1999), J. Chem. Technol. Biotechnol., 74, 221-226.
77. Luisi P. L., Luthi P., (1984), J. Am. Chem. Soc., 106, 7285-7288.
78. Prazeres D. M. F., Garcia F. A. P., Cabral J. M. S., (1993), Biotechnol. Bioeng., 41, 761-770.
79. Prazeres D. M. F., Lemos F., Garcia F. A. P., Cabral J. M. S., (1993), Biotechnol. Bioeng., 42, 759-764.
80. Scartazzini R., Luisi P. L., (1988), J. Phys. Chem., 92, 829-833.
81. Luisi P. L., Scartazzini R., Haering G., Schurtenberger P., (1990), Coll. Polymer Sci., 268, 356-374.
82. Schuleit M., Luisi P. L., (2000), Biotechnol. Bioeng., 72, 249-253.
83. Fadnavis N. W., Luisi P. L., (1989), Biotechnol. Bioeng., 33, 1277-1282.
84. Hilhorst R., Laane C., Veeger C., (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3927-3930.
85. Rao A. M., John V. T., Gonzalez R. D., Akkara J. A., Kaplan D. L., (1993), Biotechnol. Bioeng., 41, 531-540.
86. Ichinohe D., Saitoh N., Kise H., (1988), Macromol. Chem. Phys., 199, 1241.
87. Sawada K., Ueda M., (2001), J. Biotechnol., 89, 263-269.
88. Hochköppler, Pfammatter N., Luisi P. L., (1989), Chimia, 43, 348-350.
89. Fadnavis N. W., Desphande A., Chauhan S., Bhalerao U. T., (1990), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 21, 1548-1550.