



Enzymy drobnoustrojów psychrofilnych i ich biotechnologiczne znaczenie

Marianna Turkiewicz, Ewa Gromek

Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka, Łódź

Enzymes of psychrophilic microorganisms and their biotechnological importance

Summary

The majority of natural, cold habitats occurred to be sources of psychrophilic and psychrotrophic microorganisms, producing cold-adapted enzymes. They exhibit high activity and catalytic efficiency at low and moderate temperatures, which results from the elevated flexibility of their molecules. Structural differences between psychrophilic enzymes and their counterparts originating from mesophiles and other organisms are rather subtle and do not involve changes of molecular catalytic mechanisms. Because of high activity at low temperatures and an increased thermostability they are attractive biocatalysts for many biotechnological purposes, some of which are presented in this paper.

Key words:

psychrophiles, cold-adapted enzymes, biotechnology.

1. Wstęp

Do tej pory sklasyfikowano około 3200 enzymów (1), jednakże ocenia się, że w naturze występuje ich kilkakrotnie więcej i prawdopodobnie dla wielu reakcji chemicznych, obecnie spoza zasięgu biokatalizy, można będzie znaleźć specyficzny enzym. Uważa się, że większość dotąd nie odkrytych i nie sklasyfikowanych natywnych enzymów występuje w świecie drobnoustrojów i właśnie w obrębie tej grupy organizmów najintensywniej się ich poszukuje. Wynika to stąd, że mikroorganizmy wykazują najwyższe zdolności adaptacyjne spośród wszystkich żywych ustrojów i m.in. dzięki działaniu swych enzymów mogą egzystować nawet w tych biotopach, w których inne

Adres do korespondencji

Marianna Turkiewicz,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź;
e-mail:
mtur@ck-sg.p.lodz.pl

biotechnologia

1 (48) 171-188 2000

formy życia nie są w stanie przetrwać. Dlatego też szczególne zainteresowanie skupia w ostatnich latach aparat enzymatyczny drobnoustrojów ekstremofilnych, do których należą m. in. organizmy psychrofilne. Stanowią one jedną z trzech dużych kategorii, na które podzielono wszystkie drobnoustroje na podstawie ich temperatur kardynalnych. Mikroorganizmy termofilne charakteryzuje optymalna temperatura wzrostu przewyższająca 50°C, mezofile najobficiej rosną w przedziale 20-40°C, natomiast drobnoustroje psychrofilne wykazują zdolność wzrostu w 0°C (2), są zatem przystosowane do bytowania w zimnych środowiskach.

Enzymy tych drobnoustrojów, przez wielu autorów określane mianem enzymów psychrofilnych (ang. *psychrophilic enzymes*), „zimnych” lub „adaptowanych do zimna” enzymów (ang. *cold, cold-adapted enzymes*) (3), a nawet psychrozymów, są zaliczane do tzw. ekstremozymów, czyli białkowych katalizatorów organizmów ekstremofilnych (4). Wyrazem znaczenia, jakie się im przypisuje, są liczne programy badawcze, finansowane ze środków rządowych głównie w Stanach Zjednoczonych i w krajach Unii Europejskiej (4-7). Dąży się w nich nie tylko do znalezienia takich natywnych odpowiedników obecnie wykorzystywanych przemysłowo enzymów mezofilnych, które usprawnią i obniżą koszty procesów, ale także poszukuje unikatowych, dotąd nie znanych biokatalizatorów.

Ekstremozymy, wytwarzane w warunkach przemysłowych przez swych naturalnych producentów, albo też przez rekombinowane drobnoustroje, mogą w sposób zasadniczy poszerzyć asortyment i zwiększyć wartość komercyjną produkowanych biokatalizatorów. Amerykańska biotechnologiczna spółka Diversa z San Diego, która podpisała umowę z zarządem Narodowego Parku w Yellowstone, zobowiązując ją do gromadzenia i utrzymywania w celach badawczych i komercyjnych kolekcji mikroorganizmów zasiedlających te tereny, ocenia, że światowy rynek enzymów, w tym ekstremozymów, osiągnie w najbliższym dziesięcioleciu wartość ok. 17 mld USD, z których 5 mld przypadnie na biokatalizatory wykorzystywane w produkcji farmaceutyków (8).

Istotną poznawczo częścią badań nad ekstremozymami jest określenie na poziomie molekularnym strukturalnych przyczyn ich działania w warunkach, które same w sobie są, lub mogą być denaturujące dla innych białek. Znajomość tych właściwości powinna w dalszej perspektywie umożliwić projektowanie nowych, przystosowanych do konkretnych technologii białek enzymatycznych. Równie ważną korzyścią badań nad ekstremozymami pochodzenia mikrobiologicznego jest poszerzenie kolekcji czystych kultur o szczepy bytujące w środowiskach słabo jeszcze zbadanych pod względem biologicznym. Ma to ogromne znaczenie dla wiedzy o bioróżnorodności naszej planety, która ciągle jest jeszcze bardzo ograniczona. Ocenia się np., że do tej pory wyizolowano i opracowano warunki hodowli dla nie więcej niż 1% gatunków drobnoustrojów zasiedlających Ziemię (4).

Wśród ekstremozymów największe zainteresowanie budzą enzymy termofili, intensywnie badane od kilkunastu lat (4,9). Prace te były i są inspirowane przede wszystkim komercyjnym sukcesem polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (Taq polimeraza), wykorzystywanej w amplifikacji DNA (PCR). Badania enzymów wytwarzanych przez drobnoustroje zimnolubne są znacznie mniej zaawansowane i dopiero w ostatnich latach obserwuje się wyraźny wzrost liczby publikacji dotyczących izolowania, oczyszczania oraz charakterystyki kinetyczno-molekularnej, głównie lipaz, glikozydaz i proteaz, wytwarzanych przez szczepy pochodzące ze środowisk polarnych i z innych zimnych obszarów (3,10).

2. Mikroorganizmy psychrofilne – źródło zimnych enzymów

Termin psychrofile został wprowadzony do literatury w 1902 r. przez Schmidta-Nielsena (11), który w ten sposób określił drobnoustroje zdolne do wzrostu i namnażania w 0°C. Zgodnie z późniejszą definicją Stokesa (12) psychrofile są to mikroorganizmy, które w temperaturze 0°C w czasie do dwóch tygodni tworzą makroskopowo widoczne kolonie. Zdolność ta nie określa jednak w sposób ścisły ich preferencji środowiskowych. Dla większości tych drobnoustrojów jest to jedynie przystosowanie do chłodnego klimatu, ponieważ równie dobrze, a czasem nawet lepiej, mogą rosnąć w temperaturach z dolnego zakresu temperatur wzrostowych mezofili. Z drugiej strony, znane są również szczepy o fizjologii tak dalece przystosowanej do życia w temperaturach zbliżonych do 0°C, że już w umiarkowanie ciepłym otoczeniu kolonia zamiera, a nawet dochodzi do autolizy komórek. Z tego względu organizmy psychrofilne zostały podzielone na obligatoryjne, czyli właściwe psychrofile, o optymalnej temperaturze wzrostu nie wyższej niż 15°C i maksymalnej nie przekraczającej 20°C oraz fakultatywne, nazwane psychrotrofami, o optymalnej temperaturze wzrostu z zakresu 20-25°C (13). Wśród tych ostatnich rozróżniono stenopsychrotrofy, dla których maksymalna temperatura wzrostu jest niższa od 40°C i eurypsychrotrofy, rosnące jeszcze w tej temperaturze (14).

Mikroorganizmy psychrofilne i psychrotrofowe stanowią najliczniejszą na naszej planecie grupę drobnoustrojów, występującą w rozmaitych ekosystemach, i to nie tylko w tych, które są zlokalizowane na obszarach o permanentnie zimnym klimacie, ale i takich, gdzie temperatura obniża się tylko lokalnie lub okresowo. Ich szerokie rozpowszechnienie i duża liczebność wynika stąd, że ponad 80% biosfery, a w przypadku mórz i oceanów nawet ponad 90% ich objętości ma temperatury niższe od 5°C (15). Drobnoustroje zimnolubne bytują przede wszystkim w zimnych wodach słodkich i morskich, w polarnych i wysokogórskich glebach, w lodzie lodowców, w roślinach i ektotermicznych zwierzętach, żyjących w chłodnym klimacie, a także w mrożonej lub chłodzonej żywności (3,10,11,15).

Mniejsza wrażliwość psychrotrofów na wahania temperatur w porównaniu z psychrofilami sprawia, że przeważają one w zimnych środowiskach, nawet w tych o stałym klimacie polarnym (16-18). Tak np. Kobori i in. (19) spośród 155 szczepów bakterii, wyizolowanych z wód antarktycznych, aż 77% sklasyfikowali jako psychrotrofy, a zaledwie 23% zaliczyli do właściwych psychrofilii. Uważa się, że te ostatnie znajdują najlepsze warunki do rozwoju w miejscach o ustalonych niskich temperaturach, zwykle poniżej 3°C (20), takich jak szczyty wysokich gór, dna oceanów, muły i osady głębokich jezior (15). Dla najbardziej zimnolubnych bakterii bytujących w tych obszarach i należących zwykle do rodzajów *Alteromonas*, *Bacillus* i *Vibrio*, optymalne temperatury wzrostu wynoszą 3-4°C, zaś maksymalne nie przekraczają 12°C (20). W odniesieniu do omówionej klasyfikacji, można takie szczepy uznać za ekstremalne psychrofile, czyli hiperpsychrofile (13,20). Należy dodać, że właściwymi psychrofilami z racji lepszego przystosowania do życia w niskich temperaturach są przede wszystkim heterotrofy (17).

Pierwszy psychrofilny mikroorganizm wyizolował prawdopodobnie Forster z górą 100 lat temu. Była to fluoryzująca bakteria, pochodząca z przechowywanej w chłodzie ryby, dobrze rosnąca w 0°C (10). Dzisiaj wiadomo, że gramujemne i gramodatnie drobnoustroje zimnolubne przynależą do wielu różnych taksonów, których większość jest po-

wszechnie znana i ma swoich przedstawicieli w bardzo zróżnicowanych biotopach. Najbardziej liczne są wśród nich gatunki z rodzaju *Pseudomonas*, co wynika przypuszczalnie z żywieniowej i metabolicznej różnorodności tych bakterii. Z innych należy wymienić zimnolubne szczepy *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas*, *Serratia*, *Escherichia*, *Proteus*, *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella* i *Lactobacillus* (3,10,11,14,15). Opiszano również psychrofilne gatunki względnych i bezwzględnych beztlenowców (15).

Drobnoustroje psychrofilne i psychrotrofowe nie ograniczają się do *Prokaryota* – występują licznie wśród drożdży, grzybów nitkowatych (3) i eukariotycznych jednokomórkowych glonów (11). Psychrofilne gatunki drożdży pochodzące z polarnego lodu, śniegu i gleby są przedstawicielami rodzajów *Torulopsis*, *Candida* (21) i *Leucosporidium* (22), zaś częściej występujące w przyrodzie drożdże psychrotrofowe, należące do rodzajów *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Hanseniaspora* i *Saccharomyces*, zostały znalezione przede wszystkim w mrożonej żywności (10). Psychrofilne pleśnie spotyka się najczęściej wśród *Penicillium* i *Cladosporium* (23), a także wśród patogennych pleśni śniegowych rodzaju *Sclerotinia* i *Typhla* (24). Znane są również psychrofilne archebakterie. Preston i in. (25) opisali psychrofilny szczep, zasiedlający symbiotycznie tkanki jednej z gąbek strefy umiarkowanej, który sklasyfikowali jako *Cenarchaeum symbiosum*. Jego optymalna temperatura wzrostu wynosi zaledwie 10°C, czyli jest aż o około 60°C niższa od optymalnej dla wzrostu innych opisanych ustrojów tego taksonu. Jeszcze wcześniej przedstawicieli *Archea* znaleziono wśród morskiego pikoplanktonu antarktycznego (26).

Prawidłowa klasyfikacja niektórych opisanych w literaturze zimnolubnych szczepów nastręcza duże trudności (11). Przykładem może być gramodatni ziarniak, sklasyfikowany jako *Micrococcus cryophilus*, który posiada charakterystyczną dla bakterii gramujemnych otoczkę, a zawartość nukleotydów GC w jego DNA różni się od typowej dla innych przedstawicieli tego rodzaju (27). Do nowych jednostek taksonomicznych należą też najprawdopodobniej gatunki określone jako *Arthrobacter glacialis* (28), *Vibrio psychroerythreus* (13), *Aquaspirillum arcuicus* (29) i wiele innych, pochodzących głównie ze środowisk antarktycznych (20,30,31).

Badania drobnoustrojów zimnolubnych mają istotny wymiar praktyczny, stwarzają bowiem szansę wykorzystania ich kultur w różnych gałęziach gospodarki oraz w ochronie środowiska. Spośród najczęściej przytaczanych perspektyw na uwagę zasługują koncepcje zastosowania tych drobnoustrojów w rejonach o chłodnym klimacie do biodegradacji ksenobiotyków i naturalnych polutantów, w tym substancji ropopochodnych (32), jak również w biogeochemii do ługowania metali, np. uranu (33). W tym kontekście duże znaczenie przypisuje się pracom zmierzającym do genetycznej charakterystyki psychrofilii (3,11,20).

3. Właściwości enzymów psychrofilnych

3.1. Termozależność i stabilność

Szybkość każdej reakcji chemicznej, a reakcji enzymatycznej w szczególności, zależy od temperatury, która wywiera silny wpływ na wszystkie stadia biokatalizy oraz na sam labilny, makromolekularny biokatalizator. Wiadomo, że obniżenie temperatury o 10°C

proceedzi do 2-3-krotnego obniżenia tempa reakcji enzymatycznej, można by zatem oczekiwać, że w przedziałach temperatur zbliżonych do 0°C działanie enzymów w ustrojach ektotermicznych i psychrofilnych powinno ustać, gdy tymczasem organizmy te doskonale funkcjonują w swoim zimnym środowisku, utrzymując kompatybilny z życiem poziom metabolizmu. Wynika to tylko w pewnym stopniu ze wzmożonej biosyntezy enzymów, kompensującej poprzez wzrost stężenia tych białek ubytki ich aktywności w niskich temperaturach, ale przede wszystkim jest spowodowane wytwarzaniem biokatalizatorów molekularnie i kinetycznie zaadaptowanych do działania w środowiskach o często skrajnie niskiej entalpii (20,34,35).

Kinetyczna adaptacja do niskich temperatur enzymów pochodzących z psychrofilii, jak również z organizmów poikilotermicznych, wyraża się kilkoma wspólnymi właściwościami tych białek (10,20,36), różniącymi je od mezofilnych odpowiedników. Należą do nich:

1) obniżone optimum temperaturowe, wynikające z przesunięcia krzywych zależności aktywności enzymu od temperatury w stronę niższego zakresu, a także znacznie niższy współczynnik temperaturowy Q_{10} , którego wartość może nawet nie osiągnąć 1,5 (37), co oznacza, że tempo reakcji katalizowanych przez psychrozymy jest limitowane wolniejszą dyfuzją substratu do enzymu w środowisku o niskiej entalpii i znacznie wyższej lepkości (lepkość wody w 0° jest 7-krotnie wyższa niż w 20°C, (38));

2) wyższe wartości – w przedziale temperatur 0-30°C – stałej katalitycznej k_{kat} , określającej reaktywność enzymu w kompleksie z substratem oraz stałej specyficzności enzymu k_{kat}/K_m , definiującej jego katalityczną skuteczność (perfekcję działania);

3) obniżona stabilność, prowadząca do szybkiej i rozległej denaturacji psychrozymów już w umiarkowanych temperaturach.

Wykładnicza zależność tempa reakcji enzymatycznych od temperatury wynika z równania opisującego stałą szybkości reakcji k (20):

$$k = \frac{\kappa \times K_B}{h} \times e^{-\Delta G^*/RT}$$

w którym: κ – jest współczynnikiem wyrażającym prawdopodobieństwo dysocjacji zaktwowanego kompleksu enzym-substrat na enzym i produkt reakcji; K_B – to stała Boltzmana ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \times \text{K}^{-1}$); h – stała Plancka ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \times \text{s}$); T – temperatura w [K]; R – stała gazowa ($8,31 \text{ J} \times \text{K}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$), a ΔG^* oznacza swobodną energię aktywacji reakcji.

Ta ostatnia wielkość jest równie podstawowa dla przebiegu reakcji jak temperatura, a każdy katalizator obniża ją w stopniu zależnym od jego natury. Dane literaturowe (20,39-43) wskazują, że enzymy zaadaptowane do zimna obniżają barierę energetyczną specyficznie przez siebie katalizowanych reakcji, i najczęściej także entalpię aktywacji (ΔH^*) (38), w stopniu większym aniżeli ich mezofilne odpowiedniki. Tak np. metaloproteinaza wytwarzana przez psychrofilny szczep *Pseudomonas fluorescens* 164/03, wyizolowany z lodowca alpejskiego na wysokości 4000 m, obniża energię aktywacji hydrolizy azokazeiny do $37,5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ (40), czyli prawie 2-krotnie bardziej od subtilizyny Carlsberg ($60 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$). Również subtilizyna S41 z antarktycznego psychrofila *Bacillus* TA41 znacznie efektywniej hydrolizuje syntetyczny substrat NSucAAPfpNA od subtilizyny mezofilnej, choć w tym przypadku różnice w wartościach energii aktywacji nie są tak duże (odpowiednio, 38,5 i $48,5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$) (43). Proteinaza z bakterii antarktycznych obniża też bar-

dziej od enzymu mezofilnego entalpię hydrolizy tego samego substratu (odpowiednio, do 36 i 46 kJ \times mol⁻¹, (43)). Energie aktywacji lipaz z antarktycznego szczepu *Psychrobacter immobilis* B10 i z mezofilnego *Pseudomonas aeruginosa* potwierdzają tę zasadę, bowiem dla pierwszego enzymu wartość bariery energetycznej reakcji lipolizy wynosi 63, zaś dla drugiego aż 110 kJ \times mol⁻¹ (44).

Rezultaty wszystkich dotychczasowych badań wskazują, że zmniejszenie energii aktywacji reakcji katalizowanych przez zimne enzymy nie wiąże się ze zmianą molekularnego mechanizmu przemiany substratu w produkt, zachodzącej z ich udziałem. Takie same jak w odpowiednich enzymach mezofilnych są w nich zwykle reszty aminokwasów katalitycznych i wiążących substrat, zbliżona jest struktura kieszeni katalitycznej. Zostało to dobrze udokumentowane dla wspomnianej już psychrofilnej subtilizyny S41, która, jak to wykazał zespół Gerday i Feller (43), działa z udziałem triady przeniesienia ładunku Ser...His...Asp, analogicznej jak w innych proteinazach serynowych, na podstawie katalizy kowalencyjnej oraz kwasowo-zasadowej. Również α -amylaza z antarktycznego psychrotrofa *Alteromonas haloplanctis* A23 (45) zawiera taką samą parę katalitycznych aminokwasów, którą stanowią dwie reszty asparagianinu (Asp-174 i Asp-264), jak α -amylazy mezofili oraz enzym trzuskowy i pleśniowa Taka-amylaza (46,47), zaś głównym aminokwasem biorącym udział w wiązaniu substratu jest w tym enzymie reszta glutaminianu (Glu-200), podobnie jak we wspomnianych amylazach. Katalityczna triada Ser...His...Asp, charakterystyczna dla lipaz różnego pochodzenia (48,49) została również zachowana w dwóch lipazach produkowanych przez antarktyczny psychrotrofowy szczep *Moraxella* TA144 (44,50), co dowodzi, że enzymy te wykorzystują identyczny jak inne lipazy molekularny mechanizm hydrolizy wiązań estrowych w triacyloglicerolach. W przytoczonych przykładach wskazuje się, że strategie adaptacji psychrofilnych enzymów do zimnego środowiska nie obejmują zmian molekularnych mechanizmów katalizy przebiegających z ich udziałem, które pozostają prawdopodobnie wspólne dla biokatalizatorów działających *in vivo* w bardzo różniących się środowiskach.

Temperatury optymalne dla aktywności enzymów drobnoustrojowyci są zwykle o 20-30°C wyższe od temperatur optymalnych dla wzrostu i namnażania wytwarzających je szczepów. Średni przedział optymalnej temperatury enzymów produkowanych przez mezofile wynosi 50-60°C (39), natomiast większość opisanych w literaturze enzymów mikroorganizmów zimnolubnych wykazuje maksymalną aktywność w zakresie 30-40°C, choć są i takie, które charakteryzują się optymalnymi temperaturami spoza tego przedziału. Tak np. jeden z pierwszych wyizolowanych z psychrofilii enzymów – dehydrogenaza izocytrynianowa *Vibrio marinus* MP-1 – wykazywała aktywność jedynie do 20°C z optimum w 7°C (51), a dehydrogenaza mleczanowa z innego szczepu tych bakterii redukowała pirogronian z maksymalną szybkością w 10°C, przejawiając aktywność tylko do 18°C (52). Wyjątkowo niskie optymalne temperatury (10-20°C w zależności od substratu) wykazywały też trzy lipazy, produkowane przez bakterie wyizolowane z wód antarktycznych przez Kärsta i in. (42). Ci sami autorzy stwierdzili jednak, że spośród kilkunastu wstępnie przez nich scharakteryzowanych proteaz, wytwarzanych przez te same antarktyczne szczepy, aż siedem enzymów serynowych miało wyraźnie podwyższone optima temperaturowe, nawet do 45-65°C, podobnie jak alkaliczna proteinaza serynowa (60°C) z psychrotrofowego szczepu *Bacillus* sp., wyizolowanego przez Margesin i in. (53) z alpejskie-

go lodowca na wysokości 3 tys. metrów. Subtilizynę S41 pochodzącą również z antarktycznego szczepu (43) cechowała natomiast optymalna temperatura z oczekiwanego przedziału, wynosząca 40°C, czyli o 25°C niższa od optimum temperaturowego homologicznej mezofilnej subtilizyny (65°C) (42). Zróźnicowane optymalne temperatury wykazują też metaloproteinazy zimnolubnych szczepów, pochodzących z różnych biotopów. Enzym wytwarzany przez *Xanthomonas maltophilia*, glebową bakterię alpejską, bytującą na wysokości 2100 m, ma wyższą optymalną temperaturę (50°C, (54)) od metaloproteinazy (40°C) produkowanej przez *Ps. fluorescens*, wyizolowany z alpejskiego lodowca na wysokości 4000 m (40). Znacznie niższymi optymalnymi temperaturami charakteryzują się natomiast metaloproteinazy szczepów antarktycznych, opisane przez Kärsta i in. (28°C, (42)) oraz Turkiewicz i in. (25-30°C, (55)). Niskie optymalne temperatury posiadają też β -galaktozydazy psychrotrofowego szczepu *Arthrobacter* D2. Mieszczą się one w zakresie 20-25°C (56), są zatem o ok. 25°C niższe w porównaniu z β -galaktozydazą *Escherichia coli*. Enzymy *Arthrobacter* D2 są w dodatku aktywne w temperaturach poniżej 15°C, w których mezofilna β -galaktozydaza nie hydrolizuje laktozy.

Niezależnie od zakresu optymalnych temperatur, enzymy drobnoustrojów zimnolubnych wykazują znaczną aktywność w przedziale 0-5°C, w którym ich mezofilne odpowiedniki są najczęściej nieaktywne. Tak np. alkaliczna fosfataza z glebowej bakterii *Arthrobacter* (57), oraz proteinazy *Ps. fluorescens* (39) zachowują w tym zakresie temperatur ok. 10% maksymalnej aktywności, zaś subtilizyna z *Bacillus* TA41 (43) i poligalakturonaza z psychrofilnego grzyba *Sclerotinia borealis* – 15% (24). Lipazy z antarktycznych szczepów *P. immobilis* (44) i *Moraxella* sp. (58), które cechuje stosunkowo niska optymalna temperatura (35°C), zachowują w 0°C aż 20-25% aktywności maksymalnej, podczas gdy ich mezofilny odpowiednik z *Ps. aeruginosa* nie jest aktywny poniżej 20°C (36). Podobne są właściwości proteinazy z psychrotrofa *Ps. fluorescens* 114, pochodzącego z osadów rzecznych, która w 0°C przejawia 24% maksymalnej aktywności, wykazywanej w 35°C (59). Wyjątkowym przystosowaniem do działania w niskich temperaturach cechuje się też metaloproteinaza antarktycznych bakterii *Sphingomonas paucimobilis* 116, bytujących w przewodzie pokarmowym kryla, *Euphausia superba* Dana, która w zakresie 0-5°C zachowuje 43-47% aktywności maksymalnej, a w -10°C – aż 38% (55).

Ceną, jaką płacą adaptowane do zimna enzymy za wysoką aktywność poniżej 30°C, jest ich duża termowrażliwość i niestabilność strukturalna powyżej tej temperatury. Zazwyczaj całkowita utrata aktywności enzymów psychrofilnych następuje w temperaturach nieco niższych lub bliskich 50°C, czyli w takim zakresie, który odpowiada dolnej granicy przedziału temperatur optymalnych dla mezozymów. Właściwość tę dobrze ilustruje odporność temperaturowa subtilizyny S41 z antarktycznego psychrofila (43), która w 50°C w ciągu 10 minut całkowicie się inaktywuje, gdy tymczasem subtilizyna mezofilna w tych samych warunkach zachowuje ponad 80% wyjściowej aktywności. Równie labilne w porównaniu z mezofilnymi odpowiednikami są metaloproteinazy szczepów alpejskich (39,40) i antarktycznych (42,55), serynowa proteinaza *Flavobacterium balustinum*, bytującego we wnętrzościach łososia (60), czy też α -amylaza z antarktycznego szczepu *A. haloplanctis* (41), która w 45°C zachowuje po 20 minutach zaledwie 20% aktywności, podczas gdy enzym z trzustki wieprzowej pozostaje w tych warunkach w pełni aktywny. Okres półtrwania lipazy *Ps. immobilis* jest w 50°C o 2 rzędy wielkości niższy w porównaniu

z enzymem mezofilnym (44). Związana ze ścianą komórkową inwertaza endemicznych psychrofilnych drożdży *Leucosporidium antarcticum* 171 zachowuje pełną aktywność jedynie do 20°C w ciągu 30 minut, natomiast enzym z mezofilnego szczepu *Saccharomyces cerevisiae* utrzymuje ją aż do 60°C, inaktywując się dopiero w 80°C [Turkiewicz i Pazgier, dane nie publikowane].

W pracach Feller i in. (20) wskazuje się, że jest możliwe podniesienie stabilności psychrozymów bez spadku ich aktywności w niskich temperaturach. Autorzy ci otrzymali muteinę wspomnianej już antarktycznej subtilizyny, w której 85 resztę treoniny zastąpili kwasem asparaginowym, stabilizującym w tej pozycji mezofilne subtilizyny. Muteina T85D charakteryzowała się 10-krotnie dłuższym w 50°C okresem półtrwania od wyjściowego enzymu, a równocześnie 2,5-krotnie wyższą od niego aktywnością w hydrolizie azokazeiny w 4°C i o 65% wyższą w 25°C. Zmienione właściwości niewątpliwie podniosły walory użytkowe enzymu i jego komercyjną atrakcyjność.

Wspomniano, że jednym z podstawowych kinetycznych przystosowań biokatalizatorów do działania w określonych warunkach środowiska jest dostosowanie wartości stałej katalitycznej k_{kat} do zakresu temperatur fizjologicznych organizmu, z którego dany enzym pochodzi. Konsekwencją są tego samego rzędu wielkości k_{kat} homologicznych enzymów w takich przedziałach temperatur, których doświadczają *in vivo* (38). Oznacza to, że np. dla dowolnego enzymu, wytwarzanego przez obligatoryjny psychrofil, k_{kat} w zakresie 5-20°C będą bardzo zbliżone jak dla homologicznych enzymów, produkowanych przez psychrotrofy, mezofile właściwe i termotolerancyjne bądź termofile w zakresach temperatur odpowiednio, 10-25, 20-35, 25-40 i 35-50°C (38). A zatem psychrozymy mają wrodzoną właściwość wysokiej aktywności molekularnej w niskich temperaturach, znacznie wyższej, aniżeli wykazują w tych samych warunkach mezozymy. Dobrym przykładem takiego przystosowania jest α -amylaza *A. haloplanctis*, której k_{kat} w hydrolizie skrobi w 4°C jest aż 7-krotnie wyższa niż amylazy trzustki wieprzowej (odpowiednio 490 i 71 s⁻¹), jednakże ten ostatni enzym w 25°C charakteryzuje się już k_{kat} tego samego rzędu wielkości (330 s⁻¹), jak zimna amylaza w 4°C (41). Stała katalityczna subtilizyny z *Bacillus subtilis* TA39 (antarktyczny psychrofil) w 5°C wynosi w hydrolizie NSucFAAFpNa 32 s⁻¹, natomiast subtilizyny Carlsberg w tych samych warunkach – 18 s⁻¹ (20). Ponieważ w 5°C obydwie enzymy cechuje identyczne powinowactwo do syntetycznego substratu ($K_m = 0,026$ mM), stała specyficzności psychrofilnej subtilizyny jest w 5°C prawie 2-krotnie wyższa niż homologicznego mezozymu (k_{kat}/K_m , odpowiednio, 1230 i 690 s⁻¹ × mM⁻¹). Jeszcze większe różnice w katalitycznej skuteczności zaobserwowano dla dehydrogenazy alkoholowej z antarktycznego psychrofila *Moraxella* TAE123, której stała specyficzności w zakresie 5-25°C jest względem etanolu 6-krotnie wyższa niż homologicznej dehydrogenazy z wątroby konia (61). Podobne zależności opisano dla wielu innych homologicznych par enzymów, m. in. β -laktamaz z bakterii antarktycznych i mezofilnych (50), czy też ksylanaz z drożdży psychro- i mezofilnych (62).

Zasada dostosowania wartości stałych Michaelisa do temperatur fizjologicznych (krzywa $K_m = f(T)$ z wyraźnym minimum), postulowana przez Hochachkę i Somerc (35) na podstawie kinetycznych badań homologicznych enzymów organizmów endo- i ektotermicznych, jest na ogół zachowana również w przypadku enzymów wytwarzanych przez zimnolubne mikroorganizmy (63), jednakże powinowactwo enzymów psychrofilnych do

substratów jest w niskich temperaturach rzadko kiedy wyższe od wykazywanego w tych samych warunkach przez te homologiczne enzymy mezofilne, które pozostają aktywne poniżej 15-20°C (20).

Dostosowania metaboliczne mikroorganizmów zimnolubnych do niskich temperatur nie ograniczają się jedynie do takich zmian właściwości ich enzymów, które owocują podwyższoną aktywnością w niskich temperaturach, ale obejmują także:

- zwiększenie tempa biosyntezy enzymów (3,10,64), indukowane obniżeniem temperatury poniżej optymalnej dla wzrostu, w którym istotną rolę odgrywają białka szoku zimna (ang. *cold shock proteins, csp*) (11); jest to mechanizm niekorzystny energetycznie,
- syntezę tych izozymów (34,65), które są lepiej dostosowane do działania w niskich temperaturach, a także enzymów zintegrowanych z komórką, co zwiększa ich stabilność (11), oraz
- szybszy metabolizm białek (11,35), prowadzący do kompensacji strat energetycznych związanych z ich wzmożoną biosyntezą.

Wzrost szybkości biosyntezy adaptowanych do zimna drobnoustrojów, indukowany temperaturą, jest niekiedy bardzo wysoki. Tak np. psychrotrofowe antarktyczne szczepy *Moraxella* o optymalnej temperaturze wzrostu 25°C wytwarzają w 3°C 6-krotnie więcej lipaz (58), a wydajność biosyntezy α -amylazy *A. haloplanctis* w 25°C osiąga zaledwie 6% wydajności w 4°C (41).

3.2. Adaptacje molekularne

Podłożem kinetycznego dopasowania psychrofilnych enzymów do niskich temperatur są ich szczególne właściwości molekularne. Somero i Hochachka (34,35,66) już w latach siedemdziesiątych, gdy badania zimnych enzymów dopiero się rozpoczynały i nie istniały bliższe dane o ich strukturze, założyli, że te białka musi charakteryzować znacznie większa elastyczność molekularna niż enzymy przystosowane do działania w umiarkowanych temperaturach. Wskazywała na to analiza termodynamicznych zjawisk, które powinny towarzyszyć cyklowi katalitycznemu w niskiej temperaturze. W tych warunkach wskutek znacznego wzrostu lepkości roztworów wodnych i spadku szybkości dyfuzji solutów, wiązanie substratu przez enzym winno być znacznie wolniejsze, jeśli jednak taki kompleks się utworzy, prawdopodobieństwo jego rozpadu jest na skutek redukcji ruchów termicznych reaktantów znacznie mniejsze niż podczas katalizy w wyższych temperaturach (38). Z tego samego powodu trudniejsze może być osiągnięcie stanu tranzycji, warunkującego zajście reakcji enzymatycznej. Istotą tego stanu jest powstanie naprężeń w substracie, dzięki mniej lub bardziej rozległym zmianom konformacyjnym enzymu. Wreszcie, uwolnienie produktu w środowisku o zredukowanej entalpii również może być utrudnione, a bez tego nie rozpocznie się kolejny cykl katalityczny (38). Przewyciężenie tych niekorzystnych zjawisk wymaga zwiększenia elastyczności molekuley zimnego enzymu.

Założenia Somero i Hochachki są dziś już dobrze udokumentowane dzięki zbadaniu zarówno metodą bezpośredniej analizy krystalograficznej, jak i komputerowego modelowania molekularnego struktury wielu enzymów organizmów ektotermicznych (głównie ryb z zimnych akwenów (67-70)) i drobnoustrojów zimnolubnych. Jeśli chodzi o te ostat-

nie, do tej pory określono za pomocą dyfraktometrii rentgenowskiej pełną strukturę zaledwie trzech enzymów, w tym dwóch wytwarzanych przez szczepy antarktyczne, tj. α -amylazy *A. haloplanctis* (1,85 Å (71)), alkalicznej metaloproteinazy *Ps. aeruginosa* (2,1 Å (72)) oraz izomerazy triozofosforanowej, produkowanej przez psychrofilną bakterię *V. marinus* (2,7 Å (73)). W przypadku tego ostatniego enzymu pomiarom dyfraktometrycznym poddano kryształy dwóch pochodnych izomerazy: z siarczanem i 2-fosfoglikolanem, czyli analogiem właściwego substratu (fosfodihydroksyaceton). Prawdopodobne sfałdowanie łańcucha polipeptydowego określono też metodą pośrednią dla kilku innych drobnoustrojowych zimnych enzymów, opierając się na sekwencji nukleotydów w ich genach i biorąc pod uwagę homologię struktury I-rzędowej z odpowiadającymi im mezozymami o znanej strukturze przestrzennej. W ten sposób zaproponowano model konformacji antarktycznej subtilizyny T41 w odniesieniu do subtilizyn mezofilnych Carlsberg i BPN' (43), β -laktamazy z antarktycznego szczepu *P. immobilis* (50), w 40% homologicznej z enzymem *Enterococcus cloacae* o znanej strukturze (74) oraz lipazy z antarktycznego psychrofila *P. immobilis* B10 (44). Ponieważ ten ostatni enzym wykazywał tylko 11% sekwencyjnej identyczności z jedyną bakteryjną lipazą o rozwiązanej strukturze przestrzennej, syntetyzowaną przez *Pseudomonas glumae* (75), natomiast jego homologia z dehalogenezą haloalkanów *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (76) była znacznie wyższa (21%), model psychrozemu zbudowano na bazie konformacji obu tych mezofilnych białek.

Można się spodziewać, że wkrótce zostaną zbudowane z użyciem grafiki komputerowej modele następných drobnoustrojowych enzymów zimnolubnych, których struktury I-rzędowe zostały już ustalone na podstawie sekwencji ich genów. Należą do nich syntetyzowana w postaci preprobiałka serynowa proteinaza *Shewanella* AC10, działająca na podstawie triady przeniesienia ładunku Asp30....His65....Ser369 (77), inna serynowa proteinaza psychrotroficznej bakterii *F. balustinum* P104, bytującej we wnętrzościach łososia (60), a także lipaza z *Pseudomonas* sp. B11-1, wyizolowanego z gleby alaskańskiej (63). Ten ostatni enzym zbudowany z 308 aminokwasów jest w przeciwieństwie do dotychczas opisanych lipaz niewrażliwy na PMSF – inhibitor enzymów serynowych, co może sugerować jego działanie na bazie odmiennego mechanizmu katalitycznego.

W porównawczej analizie trójwymiarowych struktur wymienionych par homologicznych enzymów w pełni potwierdzono, że podstawową adaptacją do niskich temperatur jest u psychrofilnych enzymów wysoka giętkość stanu sfałdowania cząsteczki (20,36,38,41,48,55,78), bez istotnych zmian w strukturze II-rzędowej, za to z licznymi zmianami w pętłach łańcucha polipeptydowego, często dłuższych niż w mezofilnych odpowiednikach (20,36). Przykładowo w α -amylazie *A. haloplanctis* (41,45) została zachowana architektura trzech domen A, B i C, obecnych też w amylazach mezofilnych bakterii i trzustkowym enzymie wieprzowym (79), z którym enzym antarktyczny wykazuje 53% izologii sekwencyjnej. W domenie A tej amylazy występuje typowa struktura naddrugorzędowa $(\beta/\alpha)_8$ cylindra, domena B wykazuje prawie identyczną strukturę β -faldową, zaś C-terminalna domena C, choć ma typowy jak w innych α -amylazach charakter globularny i składa się z ułożonych przeciwbieżnie β -struktur (41), ma jednak większe rozmiary niż w mezozymach. Również w cząsteczce antarktycznej subtilizyny S41 zachowanych jest 9 helis i 8 β -skrętów (20), obecnych też w enzymach mezofilnych, z którymi subtilizyna S41 wykazuje 50% homologii sekwencyjnej. W enzymie z bakterii antarktycznych w pętli

łańcucha polipeptydowego łączącej β -skręt B7 z helisą H6, 210 reszta prolina obecna w subtilizynach mezofilnych jest podstawiona znacznie większą resztą fenyloalaniny, co według Fellera i in. (20) zwiększa giętkość tej pętli i prawdopodobnie również ruchliwość helisy H6, w której występuje aktywna seryna triady katalitycznej. W subtilizynie S41, której cząsteczka składa się z 309 aminokwasów, czyli z 34-35 więcej niż wchodzi w skład jej mezofilnych odpowiedników, występują też na powierzchni molekuly cztery znacznie dłuższe pętle.

Inną bardziej ogólną cechą wielu zimnych enzymów jest niższa zawartość proliny. Aminokwas ten obniża entropię stanu zdenaturowanego, czyli zwiększa stabilność stanu natywnego (41,80), zatem jego delecja lub podstawienie korzystnie wpływa na elastyczność molekuly. Obniżoną zawartością proliny charakteryzuje się m. in. antarktyczna α -amylaza, w której zostało zachowanych zaledwie 9 reszt tego aminokwasu (41), z 23 obecnych w enzymie z trzustki zwierzęcej (79). Pozostałe, obecne głównie w pętlach amylazy zwierzęcej, w enzymie psychrofilnym uległy albo delecji, albo zostały podstawione niewielkimi resztami, głównie alaniną. Również lipaza *P. immobilis* (44) zawiera o 40% mniej reszt proliny niż jej mezofilny odpowiednik (76).

Korzystna energetycznie jest w zimnych enzymach wyższa zawartość glicyny (20), której skupiska w sekwencjach zawierających histydyne i serynę triady katalitycznej obserwowano w antarktycznych lipazach z *Moraxella* TA144 (81) i *P. immobilis* B10 (82). Według autorów tych badań zwiększona zawartość glicyny, która przeciwnie niż prolina obniża stabilność stanu natywnego (80), zapewnia w zimnych lipazach wzrost liczby stopni swobody reszt aktywnego centrum (20). Wyraźne nagromadzenie małych reszt aminokwasów stwierdzono też w pobliżu katalitycznych reszt asparaginianu α -amylazy *A. haloplanctis* (45).

Antarktyczne lipazy charakteryzują się 2-krotnie niższym molowym stosunkiem reszt aminokwasów zasadowych Arg/Arg+Lys (44,81) w porównaniu z mezofilną lipazą *Ps. glumae* (76). Obniżona zawartość argininy prowadzi do spadku liczby jednoczesnych oddziaływań elektrostatycznych między jej grupą guanidynową a dwoma resztami aminokwasów kwaśnych (Asp i/lub Glu), co powoduje w rezultacie wzrost giętkości łańcucha polipeptydowego. Spadek ilości reszt argininy w cząsteczce jest również charakterystyczny dla antarktycznej α -amylazy (41) oraz β -laktamazy (50). Pierwszy enzym zawiera 13 tych reszt, podczas gdy w amylazie trzustki wieprzowej występuje 29 arginin (79). W antarktycznej β -laktamazie jest natomiast o 6 wiązań wodorowych z udziałem argininy mniej niż w homologicznym mezofilnym enzymie *E. cloacae* (74).

Enzymy psychrofilne cechuje wyższy współczynnik kohezji (obniżona spójność molekuly), a także wyraźnie niższa liczba oddziaływań hydrofobowych, co sprawia, że rdzeń cząsteczki zajmuje znacznie mniejszą objętość aniżeli w homologicznych enzymach mezofilnych. Tak np. w antarktycznej subtilizynie brak jest jakichkolwiek oddziaływań między resztami aromatycznymi (43), gdy tymczasem w jej mezofilnych odpowiednikach, subtilizynach BPN' i Carlsberg, występuje 4-5 takich interakcji (83,84), a w termitazie (termofilny odpowiednik subtilizyn) aż 11 oddziaływań aromatycznych (85). Ponieważ oddziałujące ze sobą pierścienie aromatyczne tworzą kąt dwuścienny 90° , ich obecność zwiększa objętość hydrofobowej fazy białka enzymatycznego. Niższą liczbą interakcji aromatycznych względem enzymu trzustkowego cechuje się też α -amylaza *A. haloplanctis*

(odpowiednio, 20 i 9, (41)), mająca bardzo rozluźnioną strukturę, podobnie jak β -laktamaza *P. immobilis* (50).

W adaptowanych do niskich temperatur enzymach obserwuje się natomiast zwiększenie oddziaływań z rozpuszczalnikiem, spowodowane wzrostem hydrofilowości powierzchni molekuł (3,20,36), w wyniku zwiększenia liczby reszt aminokwasów kwaśnych w tym obszarze. Na powierzchni antarktycznej subtilizyny występuje aż 21 reszt asparagianu (43) w porównaniu z 9 w subtilizynie Carlsberg (84). Wynikiem jest obniżenie się punktu izoelektrycznego z pH 9 w enzymie mezofilnym do pH 5,5 w psychrofilnym. Podobnie w antarktycznej β -laktamazie występuje 6 dodatkowych kwaśnych reszt przy N-końcu (50), które oddziałując z wodą zwiększają plastyczność cząsteczki. Według Schiffera i Dötscha (86) takie interakcje stanowią bardziej ogólny mechanizm destabilizacji konformacyjnej białek globularnych.

Charakterystyczna dla zimnych enzymów jest też obniżona liczba oddziaływań elektrostatycznych w molekule, np. z 5 w mezofilnej subtilizynie BPN' (83) do 2 w enzymie antarktycznym (43). Dla porównania termoliza zawiera aż 10 mostków solnych (85). W α -amylazie z *A. haloplanctis* zachowało się jedynie 7 takich mostków w porównaniu z 19 w enzymie trzustkowym (41,79). Nie stwierdzono natomiast różnic tego parametru w homologicznych lipazach: psychrofilnej z *P. immobilis* (3 mostki, (44)) i mezofilnej z *Ps. glumae* (2 mostki, (75)). Adaptacja antarktycznej lipazy do niskich temperatur wiąże się natomiast, obok zmniejszenia się zawartości argininy, z wyraźnie obniżoną hydrofobowością cząsteczki, bowiem w tym enzymie zachowało się tylko 19 reszt apdarnych w porównaniu z 40, obecnymi w enzymie mezofilnym.

Najtrudniejsze do zdefiniowania, jak się okazało, są molekularne przyczyny adaptacji do niskich temperatur izomerazy triozofosforanowej *V. marinus*, w 66% homologicznej sekwencyjnie z izomerazą mezofilną *E. coli* (73). Obydwa enzymy mają prawie identyczną strukturę przestrzenną. Jedyne zaobserwowane różnice to o 1 aminokwas dłuższa helisa H2 w psychrozymie oraz podstawiona alaniną 238 seryna. Ta ostatnia zmiana, jak się wydaje, jest podstawowa dla psychrofilnej izomerazy, bowiem muteina tego enzymu A238S, jak się okazuje, jest znacznie bardziej termostabilna od natywnego enzymu (7).

Reasumując, zmiany w molekularnej strukturze enzymów psychrofilnych są bardzo subtelne i właściwie każdy indywidualny enzym wypracowuje swój własny model molekularnej adaptacji do niskiej temperatury, wykorzystując różne kombinacje możliwych do zmiany bez naruszenia podstawowego mechanizmu katalizy interakcji bądź substitucji aminokwasów. Ogólna strategia tych zmian prowadzi do obniżenia wartości swobodnej energii stabilizacji natywnego stanu cząsteczki psychrozymu ($\Delta G_{\text{stab}} = \Delta G_{\text{n} \rightarrow \text{d}}$; n – stan natywny, d – zdenaturowany), której wartość dla enzymów mezofilnych mieści się w granicach 5–15 kcal \times mol⁻¹ (87). Obniżenie ΔG_{stab} o 3–6,5 kcal \times mol⁻¹ powoduje spadek termostabilności enzymu o 12°C, a ta wartość odpowiada energii zaledwie kilku słabych oddziaływań (80). Co ciekawe, w enzymach drobnoustrojów termofilnych i hipertermofilnych ulegają wzmocnieniu te same interakcje, które w psychrozymach są osłabiane, a podstawienia aminokwasów mają w obu typach enzymów przeciwny charakter (9,80), można zatem mówić o pewnej ogólnej ciągłości strategii adaptacji białek do temperatury (88).

4. Biotechnologiczny potencjał zimnych enzymów

Użytkowe właściwości enzymów pochodzących z drobnoustrojów psychrofilnych i psychrotrofowych są bezsporne, a w wielu procesach zastąpienie enzymów mezofilnych biokatalizatorami adaptowanymi do zimna mogłoby przynieść liczne korzyści technologiczne i ekonomiczne, wynikające z obniżenia temperatury procesu, a mianowicie:

- zmniejszyć ryzyko zakażeń drobnoustrojami mezofilnymi, i co za tym idzie, ewentualnych mikrobiologicznych zanieczyszczeń produktu,
- obniżyć koszty procesu dzięki odstąpieniu od drogich systemów grzewczych,
- skrócić czas i obniżyć temperaturę niezbędną dla inaktywacji termolabilnego enzymu po skończonym procesie, a w przypadku użycia mieszaniny enzymów o różnych profilach temperaturowych umożliwić selektywną inaktywację enzymu psychrofilnego w łagodnych warunkach,
- poprawić jakość produktu końcowego, jeśli w podwyższonej temperaturze może on ulec niekorzystnej modyfikacji,
- umożliwić utylizację licznych odpadów w temperaturze otoczenia w zimnym i umiarkowanym klimacie.

Potencjalnymi odbiorcami psychrofilnych enzymów są przede wszystkim przemysł spożywczy i chemia gospodarcza (3,10,11). Niektóre z tych biokatalizatorów mogą także stanowić cenne narzędzie w biotransformacjach wymagających niskich temperatur oraz w biologii molekularnej (19,38).

Dobrym przykładem korzyści technologicznych, jakie można by osiągnąć zastępując enzym mezofilny psychrofilnym odpowiednikiem, jest proces hydrolizy laktozy, stanowiącej jeden z głównych składników mleka (3,6-5%) i serwatki (63-69%) – uciążliwego odpadu przemysłu mleczarskiego (89). Osoby z nietolerancją tego disacharydu, powodującą poważne zaburzenia jelitowe, powinny spożywać mleko pozbawione laktozy na drodze hydrolizy, dzięki której zwiększa się także słodycz mleka i serwatki, co czyni te surowce bardziej atrakcyjnymi dla produkcji lodów oraz syropu stosowanego w cukiernictwie. Obecnie używa się w rozkładzie laktozy β -galaktozydazę mezofilnego szczepu *Kluyveromyces* sp. o optymalnym pH 6-7. Aby w takim pH nie dopuścić do zakażeń, hydrolizę laktozy w mleku lub serwatce prowadzi się krótko (4 godziny) w 30-40°C, choć w tych warunkach stopień rozkładu cukru jest niski. Pożądaną, 70-80% stopień hydrolizy można przy użyciu tego samego enzymu osiągnąć także w 5-10°C, gdy ryzyko zakażeń jest minimalne, jednakże czas procesu wydłuża się wówczas aż do 24 godzin. Rozwiązania problemu upatruje się w wykorzystaniu enzymu psychrofilnego o odpowiednio wysokiej skuteczności katalitycznej w niskich temperaturach (11,89). Takiej β -galaktozydazy, jak dotąd nie opisano.

Poszukuje się też psychrofilnej podpuszczki. Obecnie stosowanymi w serowarstwie zamiennikami drogiej i trudno dostępnej chymozyny cielęcej są proteazy niektórych pleśni (*Mucor miehei*, *Endothia parasita*), cechujące się dużą termostabilnością, co wymaga użycia wysokiej temperatury dla ich skutecznej inaktywacji, zapobiegającej zbyt głębokiej proteolizie białek mleka. Donoszono wprawdzie o termolabilnych preparatach drobnoustrojowych rennin (Modilase) (89), jednak stosuje się je dotąd w niewielkiej skali. W Japonii próbowano natomiast wykorzystać zimne proteazy do wytwarzania w 5°C

skrzepu mleka sojowego. Okazało się, że jego zwięzłość była znacznie niższa w porównaniu ze skrzepami otrzymanymi metodą klasyczną, przy użyciu papainy lub bromelainy (10). Niektóre z wytwarzanych przez psychrofile proteinaz oraz α -amylaz nadają się do wykorzystania w piwowarstwie i w piekarnictwie, jednakże ich produkcja dopiero wówczas byłaby opłacalna, gdyby zastosować w niej rekombinowane szczepy mezofilne, zawierające geny tych enzymów i nie wymagające podczas hodowli kłopotliwych systemów chłodzenia.

Enzymy pektynolityczne oraz inne glikozydazy o dużej aktywności w temperaturze otoczenia, w tym również amylazy, mogłyby znaleźć zastosowanie w przetwórstwie owoców (klarowanie soków, rozkład skrobi obecnej we wczesnych odmianach jabłek, a termolabilne proteazy o optymalnym pH zbliżonym do pH tkanki mięsnej (4-5) i odpowiednio wysokiej aktywności względem białek tkanki łącznej, tj. kolagenu i elastyny, mogłyby zastąpić obecnie używaną w tenderyzacji gorszych gatunków mięsa roślinną papainę (3).

W związku z rosnącą ilością chłodzonej i mrożonej żywności dostępnej w handlu, konieczne jest posiadanie enzymów aktywnych w niskich temperaturach, przydatnych nie tylko w przetwórstwie żywności, ale i w konserwacji gotowych produktów, np. adaptowanej do zimna oksydazy glukozowej. Ten ostatni kierunek aplikacji jest szczególnie atrakcyjny, ponieważ pozwoliłby na eliminację wielu chemicznych konserwantów wprowadzanych obecnie do żywności (90). Odpowiednio dobrane zimne enzymy mogłyby chronić chłodzone i mrożone produkty spożywcze przed rozwojem niepożądanymi drobnoustrojów, usuwając metabolity niezbędne dla ich wzrostu lub powodując lizę komórek, a także degradując inne enzymy, niekorzystnie wpływające na jakość produktu w trakcie jego chłodniczego składowania przed spożyciem.

Największym odbiorcą handlowych preparatów proteinaz, lipaz, amylaz i celuz jest obecnie przemysł detergentów piorących. Te enzymy muszą być stabilne w wysokich (>9) pH, w obecności surfaktantów i środków utleniających, a także cechować się szeroką specyficznością (proteinazy), synergizmem działania oraz nie wymagać stabilizatorów i aktywatorów. Adaptowane do zimna alkalostabilne proteinazy są już wykorzystywane w Japonii w produkcji powszechnie stosowanych środków piorących w temperaturze wody wodociągowej, co daje poważne oszczędności w zużyciu energii (10).

Bardzo interesujący sposób otrzymania aktywnej w niskich temperaturach proteinazy przedstawili ostatnio Kano i in. (91), którzy w wyniku przypadkowej mutacji (V84I) mezofilnej subtilizyny BPN' otrzymali muteinę M-15 o dwukrotnie wyższej aktywności w zakresie 0-15°C od enzymu wyjściowego i niezmięnionej termostabilności oraz aktywności w wyższych temperaturach (>25°C). Autorzy cytowanej pracy wykazali, że mutacja która zaszła w odległości 1,5 nm od katalitycznej triady subtilizyny BPN' nie spowodowała żadnych zmian konformacji enzymu.

W większości detergentów, także dostępnych na naszym rynku, stosuje się psycrotrofową lipazę o obniżonej optymalnej temperaturze (40°C), wytwarzaną w skali przemysłowej przez zrekombinowany mezofilny szczep *Aspergillus oryzae* i rozprowadzaną pod handlową nazwą Lipolase®. Warto podkreślić, że jest to pierwszy produkt wytwarzany przez genetycznie zmodyfikowany organizm (GMO), który trafił do powszechnego użycia (10).

Psychrofilne lipazy, wykorzystywane w detergentach i przydatne w serowarstwie (modyfikacja smaku i zapachu serów), mogą być też użyte jako stereospecyficzne katalizatory

(58,81), m.in. w syntezie masła kakaowego, najwydajniej przebiegającej w 15-20°C i w syntezie innych estrów wyższych kwasów tłuszczowych (92). Również enzymatyczne modyfikacje niektórych antybiotyków, np. tetracyklin, są temperaturozależne i w pożądanym sposobie przebiegają w 6-9°C (10).

Zimne enzymy są potencjalnie przydatne w przemyśle chemicznym do produkcji i modyfikacji lotnych związków organicznych. Niska temperatura takich procesów zapewniłaby nie tylko odpowiednią wydajność syntezy, ale ułatwiłaby także separację produktu (3).

Do tej pory w drobnoustrojach zimnolubnych nie znaleziono enzymu, który mógłby być równie atrakcyjny dla biologii molekularnej jak termofilna Taq polimeraza. Donoszono, że cennymi dla tego obszaru aplikacji właściwościami cechuje się alkaliczna fosfataza z morskiego antarktycznego szczepu *Vibrio* (19), jednakże dotąd brak danych o jej wykorzystaniu. Za duży sukces należy uznać wykrycie przez polskich autorów (93) w niezidentyfikowanym szczepie bakterii antarktycznych unikatowego enzymu restrykcyjnego Unbl, charakteryzującego się wyjątkowo niską optymalną temperaturą działania (15-20°C).

Większość enzymów używanych w biologii molekularnej pochodzi z *E. coli* i innych szczepów mezofilnych, bądź też z kultur tkankowych rosnących w 37°C. Ekspansja nowych doświadczalnych modeli, takich jak rośliny, nicienie czy też zimnokrwiste kręgowce (ryby, żaby) stwarza konieczność dysponowania enzymami adaptowanymi do niskich temperatur, które będzie można wykorzystać w genetycznych modyfikacjach tych ustrojów (3,11), powinno się zatem zintensyfikować badania aparatu enzymatycznego już poznanych mikroorganizmów zimnolubnych oraz poszukiwać nowych ich przedstawicieli.

5. Podsumowanie

Enzymy drobnoustrojów psychrofilnych są w sposób genetycznie uwarunkowany przystosowane do działania w niskich temperaturach. Adaptacje na poziomie molekularnym wyrażają się zwiększoną elastycznością strukturalną ich cząsteczek, która w środowisku o niskiej temperaturze umożliwia katalityczne działanie tych białek, jednakże bez istotnych zmian molekularnego mechanizmu katalizy z ich udziałem. Pozostaje on taki sam, jak u homologicznych enzymów, pochodzących z innych źródeł. Kinetyczne właściwości enzymów psychrofilnych, tj. wysoka aktywność i skuteczność katalityczna w temperaturach 0 (lub niższych) -30°C oraz ich termolabilność mają duże znaczenie dla praktycznego wykorzystania tych białek w procesach bądź wymagających niskich temperatur, bądź też przebiegających w takich warunkach co najmniej równie wydajnie jak w wyższych temperaturach, obligujących znaczne nakłady energetyczne.

Aby zimne enzymy mogły być produkowane w dużej skali, należy dążyć do ekspresji ich genów w drobnoustrojach mezofilnych, których hodowla jest prostsza technicznie i dobrze opanowana. W tym celu niezbędne jest opracowanie odpowiednich systemów wektorowych. Należy również poszukiwać systemów wektorowych, umożliwiających ekspresję niektórych mezozymów, np. degradujących polutanty i ksenobiotyki, w psychrofilnych gospodarzach.

Ustalenie dokładnych relacji między strukturą molekularną a funkcją większej liczby natywnych enzymów psychrofilnych (nie tylko z użyciem modelowania molekularnego,

ale również za pomocą krystalografii i metod spektroskopowych) będzie miało dużą wartość dla ewentualnych modyfikacji mezozymów (mutacje punktowe) w kierunku zwiększenia ich aktywności w niskich temperaturach oraz dostosowania stabilności molekularnej i katalitycznej do potrzeb konkretnych procesów.

Literatura

1. Webb E., (1992), *Enzyme Classification*, Academic Press, San Diego, London, N.Y., Sidney, Tokyo.
2. Mycielski R., (1984), *Post. Mikrobiol.*, 23, 109-121.
3. Brenchley J. E., (1996), *J. Ind. Microbiol.*, 17, 432-437.
4. Adams M. W. W., Perler F. B., Kelly R. M., (1995), *Bio/Technology*, 13, 662-668.
5. Aguilar A., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 89-92.
6. van der Oost J., de Vos W. M., Antranikian G., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 415-417.
7. Davis M. C., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 102-104.
8. Hoyle R., (1998), *Nature Biotechnol.*, 16, 312.
9. Synowiecki J., (1998), *Biotechnologia*, 42, 98-105.
10. Margesin R., Schinner F., (1994), *J. Biotechnol.*, 33, 1-14.
11. Gounot A. M., (1991), *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 386-397.
12. Stokes J. L., (1963), *General biology and nomenclature of psychrophilic microorganisms*, in: *Recent progress in Microbiology*, 8, 187-192, University of Toronto Press, Toronto.
13. Morita R. Y., (1975), *Bacteriol. Rev.*, 39, 144-197.
14. Jay J. M., (1987), *Int. J. Food Microbiol.*, 4, 25-32.
15. Świącicka J., Buczek J., Hauschild T., (1997), *Post. Mikrobiol.*, 36, 53-70.
16. Atlas R. M., Morita R. Y., (1986), *Bacterial communities in nearshore arctic and antarctic marine ecosystem*, in: *Perspectives in Microbial Ecology*, Eds. Megusar F., Gantar M., Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, 185-190.
17. Delille D., Perret E., (1989), *Microbiol. Ecol.*, 18, 117-123.
18. Herbert R. A., (1986), *The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms*, in: *Microbes in Extreme Environments*, Eds. Herbert R. A., Codd G. A., Academic Press, London, 1-23.
19. Kobori H., Sullivan C., Shizuja H., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6691-6695.
20. Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise E., Genicot S., Gerday Ch., (1996), *FEMS Microbiol. Rev.*, 18, 189-202.
21. Sinclair N. A., Stokes J. L., (1965), *Can. J. Microbiol.*, 11, 259-270.
22. Donachie S. P., Zdanowski M. K., (1998), *Aquat. Microbial Ecol.*, 14, 129-136.
23. Land C. J., Banhidi Z. G., Albertsson A. C., (1987), *Nord. J. Botany*, 7, 97-106.
24. Takasawa T., Sagisaka K., Yagi K., Uchiyama K., Aoki A., Takaoka K., Yamamoto K., (1997), *Can. J. Microbiol.*, 43, 417-423.
25. Preston C. M., Wu K. Y., Moliński T. F., DeLong E. F., (1996), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 93, 6241-6246.
26. DeLong E. F., Wu K. Y., Prezelin B. B., Jovine V. M., (1984), *Nature*, 371, 695-697.
27. Russel N. J., (1974), *J. Gen. Microbiol.*, 80, 217-225.
28. Moiroud A., Gounot A. M., (1969), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série D*, 269, 2150-2152.
29. Butler B. J., Mc Callum K. L., Inniss W. E., (1989), *Syst. Appl. Microbiol.*, 12, 263-266.
30. Mc Meekin T. A., (1988), *Hydrobiology*, 165, 35-40.
31. Irgens R. L., Suzuki I., Staley J. T., (1989), *Current Microbiol.*, 18, 261-265.
32. Westlake D. R., Jobson A., Phillippe R., Cook F. D., (1974), *Can. J. Microbiol.*, 20, 915-928.
33. Ferroni G. D., Leduc L. G., Todd M., (1986), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 32, 169-175.
34. Somero G. N., (1977), *J. Exp. Zool.*, 194, 175-188.
35. Hochachka P. W., Somero G. N., (1984), *Biochemical Adaptation*, Princeton University Press, Princeton, NY.
36. Gerday Ch., Aittaleb M., Arpigny J. L., Baise E., Chessa J-P., Garsoux G., Petrescu I., Feller G., (1997), *Biochim. Biophys. Acta*, 1342, 119-131.
37. Hard N. F., (1998), *Food Technol.*, 52, 64-67.
38. Marschall C. J. (1997), *Trends Biotechnol.*, 15, 359-363.
39. Margesin R., Schinner F., (1992), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38, 209-225.
40. Margesin R., Schinner F., (1992), *J. Biotechnol.*, 24, 207-210.

41. Feller G., Payan F., Theys F., Qian M., Haser R., Gerday Ch., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 222, 441-447.
42. Kärst U., Woehl M., Czempinski K., Schmidt R. D., (1994), 7th Int. Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Praga, Abstracts, MO122.
43. Davail S., Feller G., Narinx E., Gerday Ch., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 17448-17453.
44. Arpigny J. L., Lamotte J., Gerday Ch., (1997), *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 3, 29-35.
45. Feller G., Lonhienne T., Deroanne Ch., Libioule C., van Beeumen J., Gerday Ch., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 5217-5221.
46. Matsura Y., Kusunoki M., Harada W., Kakudo M., (1984), *J. Biochem.*, (Tokyo), 95, 697-702.
47. Swift H. J., Brady L., Derewenda Z. S., Dodson E. J., Dodson G. G., Turkenburg J. P., Wilkinson A. J., (1991), *Acta Crystallogr.*, B47, 535-544.
48. Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dodson E. J., Dodson G. G., Tolley S., Turkenburg J. P., Christiansen L., Høge-Jensen B., Nørskov L., Thim L., Menge U., (1990), *Nature*, 343, 767-770.
49. Winkler F. K., D'Arcy A., Hunziker W., (1990), *Nature*, 343, 771-774.
50. Feller G., Zekhnini Z., Lamotte-Brasseur J., Gerday Ch., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 244, 186-191.
51. Morita R. Y., Albright L. J., (1965), *Can. J. Microbiol.*, 11, 221-227.
52. Mitchell P., Yen H. C., Mathemeier P., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1332-1334.
53. Margesin R., Palma N., Knauseder F., Schinner F., (1992), *J. Biotechnol.*, 24, 203-206.
54. Margesin R., Schinner F., (1991), *FEMS Microbiol. Lett.*, 79, 257-262.
55. Turkiewicz G., Gromek E., Kalinowska H., Zielińska M., (1999), *J. Biotechnol.*, 70, 53-60.
56. Loveland J., Gutshall K., Kasmir J., Prema P., Brenchley J. E., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 12-18.
57. de Prada P., Loveland-Curtze J., Brenchley J., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3732-3738.
58. Feller G., Thiry M., Arpigny J. L., Mergeay M., Gerday Ch., (1990), *FEMS Microbiol. Lett.*, 66, 239-244.
59. Hamamoto T., Kaneda M., Horikoshi K., Kudo T., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3878-3880.
60. Morita K., Hasan Q., Sakaguchi T., Murakami Y., Yokoyama K., Tamiya E., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 669-675.
61. Tsigos I., Velonia K., Smonou I., Bouriotis V., (1998), *Eur. J. Biochem.*, 254, 356-362.
62. Adler E., Knowles J., (1995), *Arch. Biochem. Biophys.*, 321, 137-139.
63. Choo D. W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K., Esaki N., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 486-491.
64. Gügi B., Orange N., Hellio F., Burini J. F., Guilloce C., Leriche F., Guespin-Michel J. F., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 3814-3820.
65. Gutshall K., Trimbur D., Kasmir J., Brenchley J., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 1814-1820.
66. Somero G. N., (1981), *Mar. Biol. Lett.*, 2, 163-178.
67. Berglund G. I., Willassen N. P., Hansen L. Kr., Smalås A. O., (1995), *Acta Cryst.*, D51, 393-394.
68. Smalås A. O., Hardvik A., Hansen L. Kr., Hough E., Jynge K., (1990), *J. Mol. Biol.*, 214, 355-358.
69. Smalås A.O., Hordvik A., (1993), *Acta Cryst.*, D49, 318-330.
70. Genicot S., Rentier-Delrue F., Edwards D., Van Beeumen J., Gerday Ch., (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1298, 45-57.
71. Aghajari N., Feller G., Gerday Ch., Haser R., (1996), *Prot. Sci.*, 5, 2128-2129.
72. Villeret V., Chessa J. P., Gerday Ch., Van Beeumen J., (1997), *Prot. Sci.*, 6, 2462-2464.
73. Alvares M., Zeelen J. Ph., Mainfroid V., Rentier-Delrue F., Martial J. A., Wyns L., Wierenga R. K., Maes D., (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 2199-2206.
74. Lobkovsky E., Moews P. C., Liu H., Zhao H., Frère J. M., Knox J. R., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11257-11267.
75. Verschueren K., Franken S., Rozeboom H., Kalk K., Dijkstra B., (1993), *J. Mol. Biol.*, 232, 856-872.
76. Noble M., Cleasby A., Johnson L., Egmont M., Frenken L., (1993), *FEBS Lett.*, 331, 123-128.
77. Kulakova L., Galkin A., Kurihara T., Yoshimura T., Esaki N., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 611-617.
78. Jaenicke R., (1990), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 3326, 535-553.
79. Qian M., Haser R., Payan F., (1993), *J. Mol. Biol.*, 231, 785-791.
80. Veille C., Zeikus J. G., (1996), *Trends Biotechnol.*, 14, 183-190.
81. Feller G., Thiry M., Arpigny J. L., Gerday Ch., (1991), *Gene*, 102, 111-115.
82. Arpigny J. L., Feller G., Gerday Ch., (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1171, 331-333.
83. Mc Phalen C. A., James M. N. G., (1988), *Biochemistry*, 27, 6582-6598.
84. Bode W., Papamokos E., Musil D., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 166, 673-692.
85. Gros P., Betzel C., Dauter Z., Wilson K. S., Hol W. G. J., (1989), *J. Mol. Biol.*, 210, 347-367.
86. Schiffer C. A., Dötsch V., (1996), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 7, 428-432.

87. Privalov P. L., (1979), *Adv. Protein Chem.*, 33, 167-241.
88. Feller G., Arpigny J. L., Narinx E., Gerday Ch., (1997), *Comp. Biochem. Physiology Part A: Mol. Integr. Physiol.*, 118A, 495-499.
89. Herbert R., (1992), *Trends Biotechnol.*, 10, 395-402.
90. Whitaker J. R., (1990), *Food Biotechnol.*, 4, 669-697.
91. Kao H., Taguchi S., Momose H., (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 46-51.
92. Neielman S. L., (1990), *Crit. Rev. Biotechnol.*, 9, 273-286.
93. Kawalec M., Borsuk P., Piechula S., Stępień P., (1997), *Acta Biochim. Polon.*, 44, 849-852.