



Hydantoinazy, ich znaczenie, podział i zastosowanie w biotechnologii

Gniewomir Latacz, Elżbieta Pękała, Katarzyna Kieć-Kononowicz
Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Hydantoinases – significance and applications in biotechnology

Summary

Hydantoinase is an industrial enzyme widely used for the synthesis of nonnatural D- or L-amino acids. Optically pure amino acids are required for production of semisynthetic antibiotics, active peptides or agrochemicals such as pesticides, herbicides, pyrethroids, and are important as feed and food additives. Major advantages of application of hydantoinase in industry are: high efficiency, stereoselectivity, easy production of substrates for enzyme and environment friendly alternative to chemical methods.

Key words:

hydantoinase, *N*-karbamylase, racemase, D- α -amino acids, L- α -amino acids.

1. Wprowadzenie

W przemyśle farmaceutycznym, ze względów ekonomicznych i ekologicznych stosowane są metody biosyntetyczne otrzymywania związków biologicznie aktywnych. Zasługują one na szczególną uwagę. W metodach tych wykorzystuje się zdolności enzymatyczne żywych mikroorganizmów lub komórek roślinnych do przeprowadzenia reakcji biotransformacji. Obok reakcji biosyntetycznych, w których wykorzystuje się kultury komórkowe opracowywane są również coraz doskonalsze i wydawniejsze metody polegające na pozyskiwaniu czystych enzymów i preparatów enzymatycznych. Z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego, jak również spożywczego ważne jest naturalne pocho-

Adres do korespondencji

Gniewomir Latacz,
Katedra Technologii
i Biotechnologii Środków
Leczniczych,
Collegium Medicum,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. Medyczna 9,
30-688 Kraków;
e-mail:
glatacz@cm-uj.krakow.pl

biotechnologia

dzenie enzymów, a co za tym idzie, ich mała toksyczność lub jej brak (1). Najważniejszymi cechami enzymów biorących udział w procesach biotransformacji są:

- specyficzność, czyli aktywność katalityczna w stosunku do jednego typu reakcji;
- regiospecyficzność, czyli atakowanie cząsteczki substratu w ściśle określonym miejscu;
- stereospecyficzność, aktywne centrum enzymu ma strukturę asymetryczną, dzięki czemu enzym rozpoznaje w mieszaninie racemicznej izomery optycznie czynne (2).

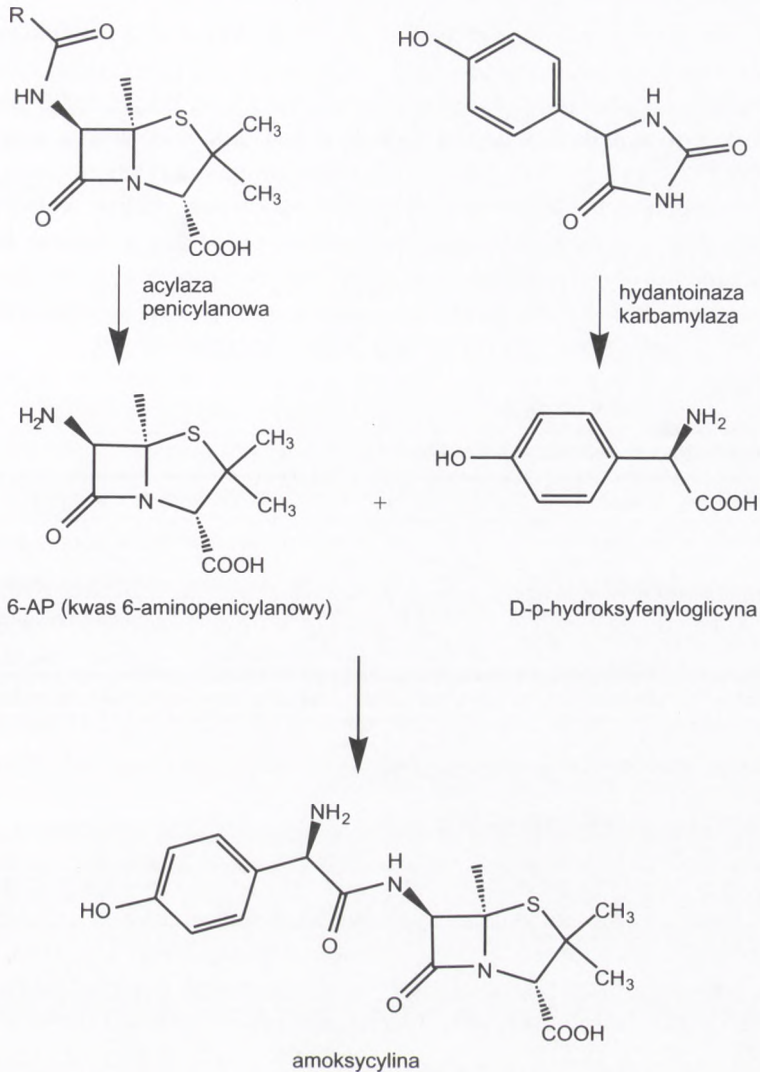
Dzięki tym właściwościom możliwe jest otrzymanie optycznie czynnych produktów z bardzo dużą wydajnością.

W szeroko opisaney w tym artykule metodzie hydantoinazowej wykorzystuje się proces biotransformacji enzymatycznej, w wyniku której, otrzymuje się optycznie czynne nienaturalne D- lub L-aminokwasy wychodząc z tanich, ogólnie dostępnych odczynników.

2. Zastosowanie D-aminokwasów

Wpływ na regulację funkcji życiowych organizmu ma bardzo wiele czynników. Jedną z podstawowych grup związków wywołujących określone reakcje biologiczne w organizmie są peptydy. Budowę peptydową mają takie substancje regulujące jak: hormony, czynniki wzrostu, neuroprzekaźniki, cytokiny, modulatory kanałów jonowych, inhibitory enzymów. Z farmakologicznego punktu widzenia niezmiernie ważna jest analiza biologicznie aktywnych peptydów metodami chemicznymi i biofizycznymi. Pozwala ona ustalić zależność pomiędzy ich budową a aktywnością. Umożliwia to racjonalne projektowanie nowych aktywnych cząstek, ponieważ sekwencja, topografia oraz konformacja peptydów jest ściśle powiązana z ich aktywnością oraz funkcją w procesach regulacji. Ta podstawowa znajomość umożliwia nam modyfikację danego peptydu, dzięki której poprawia się jego wydajność, wzrasta aktywność, selektywność, jak również odwraca się kierunek działania liganda z agonistycznej na antagonistyczną lub odwrotnie (3). Jedną z możliwości modyfikacji peptydów jest zamiana w ich strukturze pierwszorzędowej aminokwasów o konfiguracji L- na enancjomery z szeregu D. Określa się w ten sposób stereostrukuralne wymagania poszczególnych podstawników podczas interakcji liganda z receptorem oraz udział w reakcji struktury drugorzędowej. Zamiana choćby jednego aminokwasu powoduje zmiany takich elementów budowy peptydu jak α -helisa, β -skręt, struktura nieuporządkowana (4).

Niektóre peptydy, będące analogami hormonów, zawierające D-aminokwasy są stosowane z powodzeniem jako leki. Modyfikacja macierzystej struktury miała na celu polepszenie trwałości i odporności na hydrolizę, jak również w niektórych przypadkach uzyskanie działania antagonistycznego lub zwiększenie powinowactwa do receptora. Do leków z grupy zmodyfikowanych D-aminokwasami hormonów peptydowych należą: **oktreotyd** – będący analogiem hormonu podwzgórza soma-



Rys. 1. Synteza amoksycyliny z udziałem D-aminokwasu.

tostatyny, **desmopresyna** – analog wazopresyny, **gonadorelina**, **goserelina**, **buserelina** – analogi gonadoliberyny (5,6). Wiele spośród zmodyfikowanych analogów gonadoliberyny znajduje się obecnie w fazie badań klinicznych. Jednym z niedawno wprowadzonych na rynek jest lek o nazwie **cetorelix** – zmodyfikowany w pozycjach 2 i 6 analog gonadoliberyny (7). D-aminokwasy oprócz ważnej roli, jaką pełnią w poszukiwaniu modyfikowanych peptydów aktywnych farmakologicznie mają również inne zastosowanie. Wykorzystywane są w syntezie półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych; D-fenyloglicyna i jej p-hydroksypochozna są półproduktami

w syntezie **ampicyliny**, **amoksycyliny** (rys. 1), **cefadroksylu** oraz **cefaleksyny** (8). Enzymatyczna synteza p-hydroksy-fenyloglicyny na potrzeby przemysłu farmaceutycznego wynosiła pod koniec lat dziewięćdziesiątych XX w. ponad 1000 ton rocznie (12). Zapotrzebowanie na D-aminokwasy jako półprodukty do syntezy antybiotyków będzie systematycznie wzrastać wraz z wprowadzaniem na rynek nowych półsyntetycznych antybiotyków takich jak: **cefbuperzon**, **aspoksycylina**, **cefpiramid** (9). D-aminokwasy stosowane są również do syntezy preparatu o nazwie **fluwanilat**, zwalczającego chorobę pasożytniczą pszczoł oraz do syntezy pyretroidów – środków ochrony roślin. D-aminokwasy wykorzystywane są również w przemyśle spożywczym do syntezy sztucznego słodzika o nazwie **alitam** (8,10).

Tabela 1

Zastosowanie niektórych D-aminokwasów w przemyśle

Aminokwas	Zastosowanie w przemyśle
D-alanina	spożywczy – sztuczny słodzik (alitam)
D-fenyloglicyna	farmaceutyczny – antybiotyk (ampicylina)
D-p-hydroksyfenyloglicyna	farmaceutyczny – antybiotyk (amoksycylina)
D-walina	pszczelarski – pyretroid (fluwalinat)
D-seryna	farmaceutyczny – antybiotyk (D-cykloseryna)

3. Zastosowanie L-aminokwasów

Aminokwasy występujące w przyrodzie w większości są L-enancjomerami. W przemyśle spożywczym jako substancje smakowe stosowane są: kwas L-glutaminowy w postaci monoglutaminianu sodu (MNG), kwas L-asparaginowy, L-cystyna, L-alanina. Produkcja L-aminokwasów takich jak L-treonina, L-tryptofan, L-feniloalanina jest liczona w tonach, natomiast w przypadku L-lizyny produkcja dochodzi nawet do 100 000 ton rocznie (8,10). Aminokwasy te stosowane są jako dodatki do pasz lub produktów spożywczych, a ich produkcja odbywa się głównie w procesie fermentacji. Niektóre nienaturalne L-aminokwasy znajdują zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, np. L-homofeniloalanina przy produkcji inhibitorów konwertazy angiotensynowej (8).

Tabela 2

Zastosowanie niektórych L-aminokwasów w przemyśle

Aminokwas	Zastosowanie w przemyśle
1	2
L-metionina	rolniczy – dodatek do pasz
L-lizyna	rolniczy – dodatek do pasz

1	2
L-fenylalanina	spożywczy – sztuczny słodzik (aspartam)
kwasy L-asparaginowy	spożywczy – sztuczny słodzik (aspartam)
L-homofenylalanina	farmaceutyczny – inhibitory konwertazy angiotensynowej (enalapril, benazepril, chinapril, delapril, cilazapril, ramipril, lizynopril)

4. Metoda hydantoinazowa w syntezie D- i L-aminokwasów

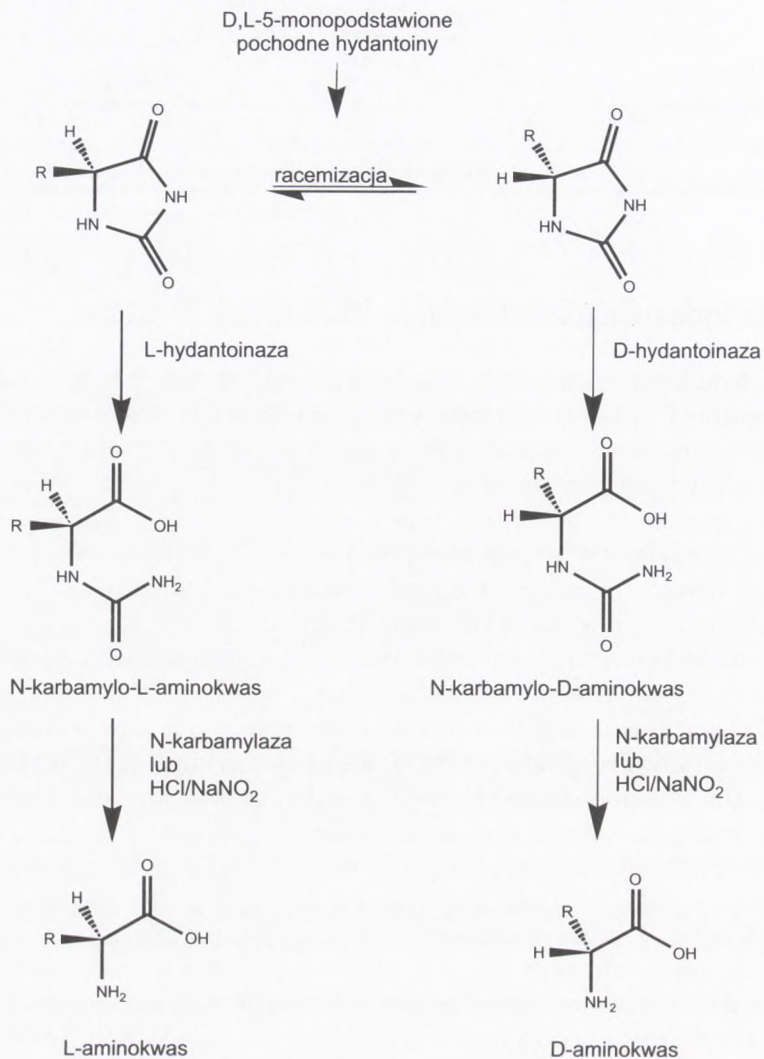
Ze względu na szerokie zastosowanie stale podejmowane są wysiłki mające na celu otrzymanie D- i L-aminokwasów z dużą enancjoselektywnością i wydajnością. Enancjomery aminokwasów można otrzymać stosując różne metody biotechnologiczne, w których możemy rozróżnić:

- 1) fermentację;
- 2) syntezę enzymatyczną, do której należą:
 - asymetryczne przyłączenie grupy aminowej,
 - asymetryczne reduktywne aminowanie,
 - „rozkład racematu” w wyniku hydrolizy jednego izomeru substancji racemicznej (11).

Metoda hydantoinazowa jest syntezą enzymatyczną polegającą na rozkładzie racemicznej substancji wyjściowej metodą enzymatycznej hydrolizy. Substratami do reakcji są D,L-5-monopodstawione pochodne hydantoiny. Synteza aminokwasów przebiega w dwóch etapach. W pierwszym etapie następuje enzymatyczne rozszczepienie pierścienia jednego z enancjomerów 5-monopodstawionej pochodnej hydantoiny w wyniku działania hydantoinazy (3.5.2.2. EC). Otrzymany związek pośredni to L lub D-N-karbamylaminokwas, który w kolejnym etapie w procesie dekarbamylacji zostaje przekształcony w odpowiedni L- lub D-aminokwas (rys. 2).

Istnieją dwie możliwości przeprowadzenia dekarbamylacji w metodzie hydantoinazowej: chemiczna oraz enzymatyczna. Zaletą chemicznej dekarbamylacji, polegającej na diazowaniu N-karbamylaminokwasu przy użyciu kwasu azotowego (III) w środowisku kwaśnym jest stosunkowo niski koszt oraz dostępność odczynników. Reakcja przebiega również dość łatwo. Jednak niektóre aminokwasy (np. tryptofan, cytrulina, pirydyloalanina) są nietrwałe w tych warunkach reakcji (13). Dlatego też nieocenione zasługi przynosi metoda dekarbamylacji enzymatycznej za pomocą N-karbamylaminokwasowych amidohydrolaz (N-karbamylaz) (3.5.1. EC), dzięki którym można uzyskać aminokwasy, które są nietrwałe w środowisku diazowania.

Kolejną zaletą użycia tych enzymów jest to, że jeśli reakcja katalizowana przez hydantoinazy nie jest enancjospetyficzna (12,14,15) to użycie odpowiedniej karbamylazy w drugim etapie zapewnia czystość optyczną produktów (16). Do głównych wad stosowania N-karbamylaz w metodzie hydantoinazowej zaliczyć trzeba przede wszystkim nietrwałość tego enzymu. Karbamylaza jest wrażliwa na temperaturę



Rys. 2. Schemat otrzymywania aminokwasów metodą hydantoinazową.

oraz czynniki chemiczne, szczególnie utleniające; enzym gwałtownie traci aktywność w obecności tlenu lub wody utlenionej (17). Używając mikroorganizmów dysponujących zarówno hydantoinazą jak i karbamylazą reakcję można przeprowadzić w jednym procesie, bez konieczności rozdzielania poszczególnych etapów. Przykładem wykorzystania reaktywności obu enzymów jest metoda otrzymywania D-aminokwasu przy użyciu szczepu *Agrobacterium radoidobacter*, gdzie substratem dla reakcji enzymatycznej jest D,L-4-hydroksyfenylohydantoina. Metodę tę opracowano na początku lat osiemdziesiątych XX w.; służyła ona do otrzymywania D-p-hy-

droksyfenyloglicyny na skalę przemysłową (18). Wydajność enzymów produkowanych przez szczepy *A. radoidobacter* okazała się niezadowalająca. Dowiedziono, że wpływ na to miała niestabilność i wrażliwość karbamyłazy oraz niedoskonałości samego mikroorganizmu. Okazało się, że bakterie te są bardzo wrażliwe na infekcje bakteriofagowe, a biokataliza z ich udziałem wymaga stałego dodawania induktorów – pochodnych hydantoiny lub dihydropiryminy (19,20). W udoskonaleniu tej metody nieocenione zasługi przyniosły narzędzia inżynierii genetycznej.

Wyizolowano geny karbamyłazy i hydantoinazy z *A. radoidobacter*, a następnie wprowadzono za pomocą wektora plazmidowego do *Escherichia coli*. Rekombinowane szczepy bakteryjne wytwarzały oba enzymy, które w sposób bardzo efektywny przekształcały D,L-5-monopodstawione pochodne hydantoiny. Najwyższą, dwukrotnie większą wydajność produkcji D-aminokwasu w odniesieniu do szczepów przemysłowych *A. radoidobacter* uzyskano w temperaturze 25°C oraz przy odpowiedniej kolejności genów, gdzie gen kodujący *N*-karbamyłazę poprzedzał gen dla hydantoinazy. Wykazano, że na efektywność procesu wytwarzania aminokwasu ma bardzo duży wpływ poziom powstającej *N*-karbamyłazy. Nadmierne stężenie tego enzymu w komórce ogranicza szybkość i wydajność reakcji (19). Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na produkcję aminokwasu jest możliwość spontanicznej racemizacji mieszaniny D,L-5-monopodstawionych pochodnych hydantoiny. Umożliwia ona nawet 100% przekształcenie substratu do odpowiedniego aminokwasu. Dobór warunków reakcji, przy których następuje racemizacja zależy od rodzaju podstawnika przy atomie C5 pierścienia hydantoiny. Racemizacja może nastąpić w podwyższonej temperaturze w środowisku alkalicznym lub w obecności racemazy hydantoinazowej, przy czym pochodne aromatyczne racemizują bardzo łatwo w podwyższonym pH natomiast pochodne alifatyczne wymagają użycia racemaz hydantoinazowych. Dlatego też oprócz genów kodujących hydantoinazę i *N*-karbamyłazę koekspresji w *E. coli* poddano racemazę hydantoinową i zastosowano do produkcji D- oraz L-aminokwasów (21,22). Do badań wyselekcjonowano szczepy *Arthrobacter aureescens* DSM 3747 i DSM 3745. Te szczepy bakterii należą do grupy niewielu poznanych do tej pory mikroorganizmów, zdolnych do przeprowadzenia reakcji otrzymywania czystych L-aminokwasów. Wyizolowane z bakterii geny racemazy, L-*N*-karbamyłazy oraz L-hydantoinazy wprowadzono do *Escherichia coli* przy użyciu różnie skonstruowanych wektorów plazmidowych (do plazmidów: pSC101, pACYC184 i pBR322 wprowadzono pojedynczo geny enzymów hydantoinazy i karbamyłazy lub połączone karbamyłazy i racemazy). Konsekwencją różnej konstrukcji plazmidów była ekspresja białek na różnym poziomie. Każdy z plazmidów posiadał promotor ramnozowy, który umożliwiał kontrolowaną ekspresję białek enzymu poprzez regulację transkrypcji. Przeprowadzone badania umożliwiły wyselekcjonowanie takiego zestawu plazmidów i zawartych w nich genów, po których wprowadzeniu aktywność enzymatyczna rekombinowanych komórek była największa. Stworzono w ten sposób bardzo efektywny, złożony z całych komórek system biokatalityczny, który zastosowano do syntezy L-tryptofanu (21). Dzięki odpowiednio dobranej ekspresji

białek możliwe było otrzymanie korzystnych dla wydajności całego procesu ilości enzymów skoordynowanych z ilością przetwarzanych substratów. Obecność racemazy wpłynęła na całkowite przetworzenie D,L-5-(3'-indolilo-metylo)hydantoiny do L-tryptofanu. W porównaniu do *Arthrobacter aurescens* ilość wyprodukowanego przez rekombinowane komórki *E. coli* L-tryptofanu wzrosła nawet sześciokrotnie (21). W przypadku D-aminokwasów zastosowano identyczną procedurę. Wyzolowano i sklonowano w *E. coli* geny odpowiedzialne za ekspresję racemazy hydantoinazowej, D-N-karbamylazy oraz D-hydantoinazy. Wyodrębniono szczepy o najwyższej aktywności i przeprowadzono próby otrzymania D-aminokwasów. Otrzymano z wysoką wydajnością (98%) D-feniloalaninę, D-tyrozynę, D-tryptofan, D-walinę, D-norwalinę, D-leucynę, D-norleucynę, oraz O-benzylo-D-serynę. Opisany system charakteryzuje ponadto wysoka enancjoselektywność ($ee = 99\%$) (22).

W celu zwiększenia efektywności oraz stabilności hydantoinazy i N-karbamylazy stosuje się również techniki immobilizacyjne. Używając różne metody immobilizacji – adsorpcyjne, kowalencyjne, inkluzyjne, osiągnięto bardzo obiecujące rezultaty. Jako trwalsze i w związku z tym, praktyczniejsze do wykorzystania w przemyśle stosowane są metody kowalencyjne. Przy immobilizacji hydantoinaz i karbamylaz z *A. aurescens* DSM 3747 posłużono się m.in. dwiema metodami kowalencyjnymi: oksiranową oraz karbodiimidową (23). W metodzie oksiranowej wiązanie do nośnika (niemodyfikowane Eupergit C oraz Eupergit 250 L) odbywa się poprzez grupy oksiranowe, natomiast w metodzie karbodiimidowej poprzez grupy aminowe (nośnik EAH Sepharose, zmodyfikowany poprzez wprowadzenie grup aminowych Eupergit C oraz Eupergit C 250 L) (23). Do immobilizacji nieoczyszczonej hydantoinazy najkorzystniejszy okazał się niemodyfikowany Eupergit C 250 L – immobilizowany na tym nośniku enzym osiągał nawet 90 % aktywności wyjściowej. Eupergit 250 L jest najczęściej stosowanym, jak do tej pory, nośnikiem do immobilizacji hydantoinaz. (23-25). W przypadku nieoczyszczonej L-N-karbamylazy stosowanie różnych metod immobilizacji nie przynosiło zadowalających rezultatów, a nawet doprowadzało do spadku jej aktywności (nawet do 4% aktywności wyjściowej) (23,26). Dopiero immobilizacja oczyszczonego rekombinowanego w *E. coli* enzymu na nośniku EAH Sepharose przyniosła korzystne efekty. W optymalnych warunkach udało się uzyskać aktywność bliską 100% (23,25). Innym nośnikiem używanym ostatnio do immobilizacji jest chityna, której użyto w próbach immobilizacji D-N-karbamylazy izolowanej z drobnoustroju *A. radoidobacter*. Enzym zastosowano następnie do produkcji p-hydroksyfenyloglicyny (27).

5. Enancjoselektywność hydantoinaz

W badaniach dotyczących występowania hydantoinaz w mikroorganizmach wykazano występowanie form D-selektywnych w przeważającej większości. Powszechność występowania D-hydantoinaz wiąże się z ważną rolą, jaką pełnią w przemianach komórkowych (metabolizm nukleotydów – hydrolizują pierścień dihydropyrimidyny)

(15). Natomiast nie wiadomo, jaka jest naturalna funkcja L-hydantoinaz. Przypuszcza się, że komórki zawierające L-hydantoinazę są w stanie hydrolizować niektóre naturalne amidy i używać je jako jedyne źródło węgla i azotu, niemniej jednak naturalne substraty dla tych enzymów nie są znane (15,21). W przypadku hydantoinaz enancjoselektywność produktu reakcji zależy zarówno od pochodzenia enzymu jak również, co ważne, od substratu. Dlatego klasyfikacja tych enzymów jako D-selektywne, L-selektywne lub nieselektywne może być nie do końca ścisła. Hydantoinaza z *Flavobacterium* sp. klasyfikowana jako L-selektywna wobec D,L-indolilometylohydantoin jest D-selektywna dla D,L-benzyluksymetylohydantoin. Ciekawą sytuację zaobserwowano w komórkach *Arthrobacter* sp. BH20 i *Arthrobacter aurescens* DSM 3745, gdzie hydroliza D,L-5-monopochodnych hydantoin w zależności od użytego substratu była ściśle D- lub L-specyficzna. W komórkach *Arthrobacter* sp. BH20 otrzymano prawie ze 100% czystością optyczną D-N-karbamoilofenyloglicynę, D-N-karbamoilometioninę, D-N-karbamoiloserynę. Ten sam mikroorganizm może przeprowadzać również reakcje L-selektywnie. Przy jego użyciu otrzymano L-N-karbamoilotryptofan (15). Wysoko oczyszczony enzym pochodzący z *A. aurescens* DSM 3745 jest z kolei w dużym stopniu L-selektywny dla indolinometylohydantoiny (nadmiar enancjomeryczny %ee = 100), z tego względu był on nazywany L-hydantoinazą. Enzym ten jest jednak nieselektywny w stosunku do metylohydroksymetylohydantoiny i D-selektywny wobec metylohydantoiny (%ee > 60) (12).

6. Mechanizm działania

Badania struktury D-hydantoinazy przy użyciu promieniowania rentgenowskiego umożliwiły dokładne określenie budowy centrum katalitycznego enzymu o wysokiej rozdzielczości (1,3 Å) i jego związku ze specyficznością substratową oraz stereoselektywnością (28). Badany enzym został wyizolowany z mikroorganizmu *Thermus* sp. (rys. 3). Wykazano, że pierścień hydantoiny łączy się w centrum aktywnym kilkoma wiązaniami wodorowymi z atomami aminokwasów łańcucha głównego: Ser 288 (pomiędzy atomem O3 pierścienia hydantoiny i atomem N aminokwasu, N1 hydantoiny i O Ser 288) oraz Asn 336: pomiędzy N1 pierścienia hydantoiny i atomem O aminokwasu. Utworzony tymczasowy tetraedryczny stan przejściowy jest stabilizowany przez dwa jony Zn^{2+} oraz resztę aminokwasową Tyr 155. Enancjoselektywność i specyficzność substratowa jest zależna od rodzaju podstawnika i jego dopasowania do hydrofobowej kieszeni tworzonej przez reszty aminokwasowe Leu 64, Cys 95, Phe152, Tyr 155, oraz Phe 159. Ułożenie reszt aminokwasów w kieszeni hydrofobowej determinuje spektrum substratowe enzymu. W przypadku badanej hydantoinazy preferowane będą hydantoiny o konfiguracji D z podstawionym pierścieniem fenylowym. Gorzej akceptowane będą już podstawniki benzylowy czy polarny p-hydroksyfenylowy. W przypadku hydantoin o konfiguracji L, posiadających duże podstawniki dochodzi do przestrzennej kolizji z resztą aminokwasową His 61 uniemożliwiając zakotwiczenie substratu w centrum aktywnym w związku z czym, enzym



Rys. 3. Trójwymiarowa struktura hydantoinazy wyizolowanej z gatunku *Thermus* sp. Za zgodą autorów (28).

będzie działał wybiórczo do konfiguracji D substratu. Hydantoiny z nie rozbudowanymi podstawnikami w pozycji 5 będą hydrolizowały bez enancjoselektywności. Brak preferencji enzymu do konkretnego enancjomeru w tym przypadku wiąże się z niewystąpieniem kolizji przestrzennej żadnego z enancjomerów z regionem hydrofobowym (28). Udział jonów Zn^{2+} świadczy o metalozależności hydantoinaz. Udowodniono, że związki chelatujące powodują ich inaktywację, a dodatek dwuwartościowych kationów metali przywraca ich aktywność (12). W badaniach rentgenograficznych wskazano na centralne położenie atomów cynku w miejscu aktywnym enzymu. Oba atomy łączą się mostkiem utworzonym poprzez aktywny jon hydroksylowy i karbamidowy fragment karboksylowanej lizyny. Innymi ligandami koordynującymi oba atomy cynku są reszty aminokwasów: His183, His 239, His 59, His 61, Asp 315, oraz cząsteczka wody. Podejrzewa się, że bliskość ($2,0-2,1\text{\AA}$) czterech pozytywnych ładunków powoduje, że w cząsteczce wody łączącej atomy cynku wiązanie wodoru jest osłabiane. Zaktywowana w ten sposób woda dokonuje nukleofilowego ataku na C-4 pierścienia hydantoiny. W kolejnym etapie dochodzi do protonowania azotu w pozycji 3 i otwarcia pierścienia (12,28).

7. Klasyfikacja hydantoinaz wg nomenklatury EC

Hydantoinazy sklasyfikowane są zgodnie z nomenklaturą EC jako cykliczne amidazy (EC 3.5.2.). Zarówno nazwa enzymu – hydantoinaza, jak i nazwa metody hydantoinazowej wywodzą się z faktu, że enzym ten katalizuje hydrolizę pierścienia hydantoiny lub jej 5-monopodstawionych pochodnych.

Te cykliczne amidazy, które w swoim spektrum substratowym zawierają hydantoinę należą do następujących podklas:

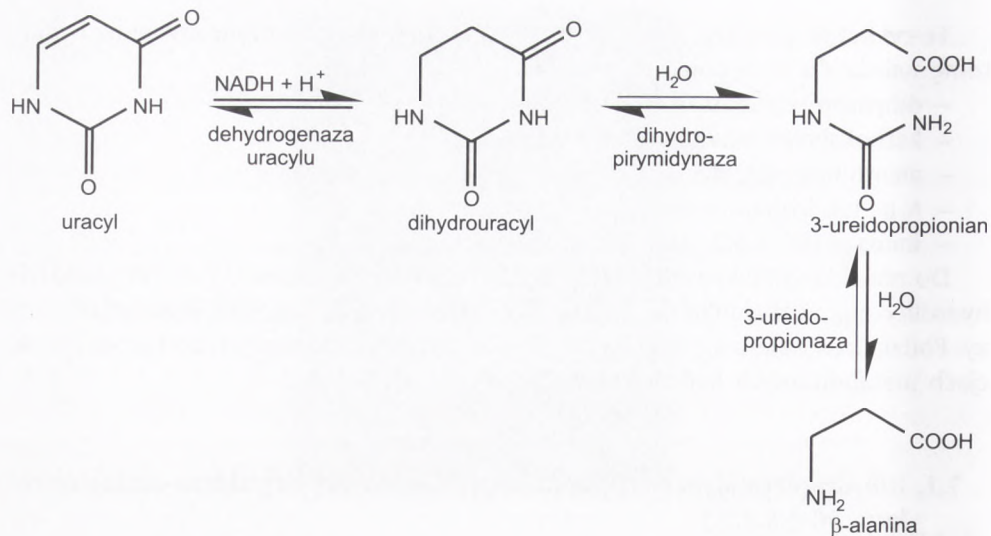
- dihydropirymidynazy (EC 3.5.2.2.),
- karboksymetylohydantoinazy (EC 3.5.2.4),
- alantoinazy (EC 3.5.2.5.),
- *N*-metylohydantoinazy (EC 3.5.2.14),
- imidazy (EC 3.5.2.16).

Do nie sklasyfikowanych jeszcze wg EC enzymów z udowodnioną aktywnością hydrolityczną w stosunku do hydantoiny należą również karboksyetylohydantoinazy. Podział ten opiera się w głównej mierze na sześciu poznanych do tej pory funkcjach metabolicznych hydantoinaz (12).

7.1. Dihydropirymidynazy (hydantoinazy, 5,6-dihydropirymidyno-aminohydrolazy, EC 3.5.2.2.)

Są to enzymy efektywnie hydrolizujące dihydrouracyl i/lub dihydrotyminę (rys. 4) biorąc przez to udział w szlaku degradacji pirymidyn u bakterii, drożdży, roślin i zwierząt. Pełnią one bardzo ważną i niekwestionowaną rolę w metabolizmie u człowieka: 1. Odkryto, że dihydropirymidynaza jest odpowiedzialna za katabolizm analogów pirymidyny, używanych jako leki: 5-fluorouracylu (29) stosowanego w terapii przeciwnowotworowej oraz deksrazoksanu stosowanego jako czynnik kardioprotekcyjny (30). 2. Stwierdzono również, że enzym ten wykazuje wyższe stężenie w guzach litych niż w normalnych tkankach (29). 3. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu dihydropirymidynaz i innych enzymów biorących udział w procesach degradacji pirymidyn mogą wywołać szereg chorób neurologicznych związanych z nieprawidłowym stężeniem neuroprzekaźników: β -alaniny oraz β -aminoizomaślanu (31).

Rośnie zainteresowanie dihydropirymidynazami ze względu na możliwość ich zastosowania w farmacji. Przykładowo enzym ten może być wykorzystany do śledzenia *in vitro* farmakodynamiki środków farmaceutycznych będących analogami pirymidyny. Ponadto informacje na temat struktury dihydropirymidynazy mogą być wykorzystywane do przewidywania hydrolizy nowych leków – analogów dihydropirymidyny lub w skryningu inhibitorów w bazach danych (12). Głównym zastosowaniem dihydropirymidynaz w przemyśle jest metoda hydantoinazowa stosowana do otrzymywania optycznie czynnych aminokwasów. Używanie nazwy hydantoinazy jako synonimu dihydropirymidynaz, jak sugeruje się w nomenklaturze EC, okazuje się nie do końca poprawne. Z gatunku *Agrobacterium* sp. wyizolowano m.in. enzym hydrolizujący 5-monopodstawione pochodne hydantoiny, nie mający jednak w swoim spektrum substratowym dihydropirymidyn (32). Inny enzym izolowany z rodzaju *Blastobacter* sp. hydrolizował zarówno pochodne hydantoiny jak i dihydropirymidyny, ale jego funkcje metaboliczne były odmienne od dihydropirymidynaz (33). Biorąc pod uwagę te wyniki możemy stwierdzić, że dihydropirymidynazy i hydantoi-



Rys. 4. Szlak degradacji pirymidyn.

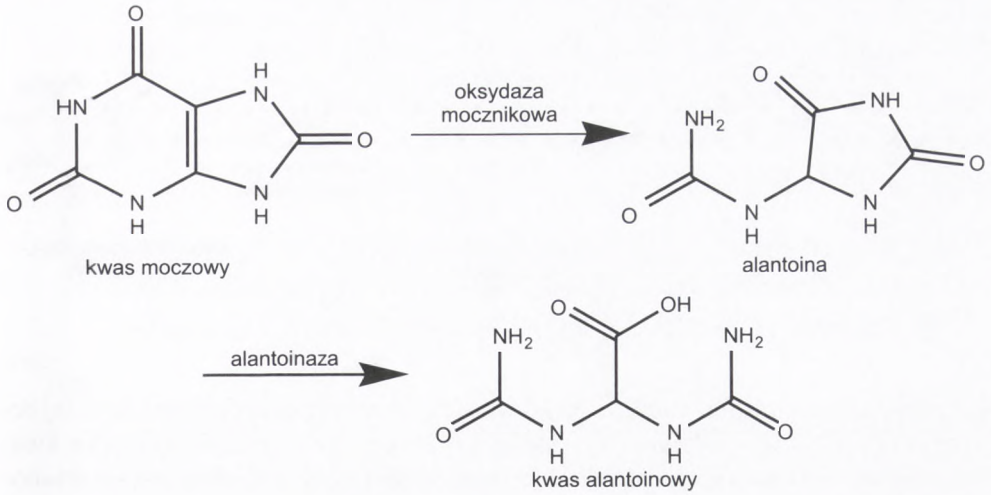
nazy nie są do końca tymi samymi enzymami. Być może w najbliższym czasie doczekamy się drobnych zmian w systematyce tych enzymów.

7.2. Alantoinazy (alantoinoamidohydrolazy, EC 3.5.2.5.)

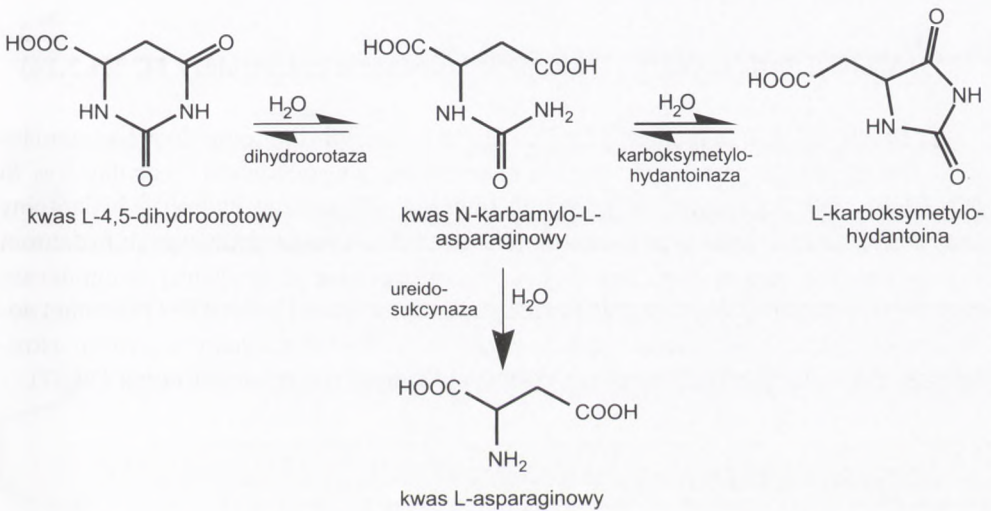
Alantoinazy są enzymami biorącymi udział w szlaku degradacji puryn, ściślej w przekształceniu alantoiny w kwas alantoinowy (rys. 5). Niektóre alantoinazy są zdolne do hydrolizy metyloalantoiny oraz 5-aminohydantoiny, aczkolwiek z bardzo małą wydajnością. Jeżeli chodzi o zastosowanie alantoinaz, brak jest dotychczas doniesień na temat wykorzystania tych enzymów do produkcji aminokwasów. Wiąże się to najprawdopodobniej z ich wysoką specyficzną substratową i małą enancjoselektywnością (12).

7.3. Karboksymetylohydantoinazy (L-karboksymetylohydantoinoamidohydrolazy (EC 3.5.2.4.)

Enzymy te katalizują reakcję będącą odgałęzieniem głównego szlaku degradacji pirymidyn. Hydrolizują karboksymetylohydantoiny do enancjoselektywnych pochodnych kwasu asparaginowego (*N*-karbamoylo-kwas-L-asparaginowy). Pochodne te za pomocą ureidosukcynazy przekształcane są do kwasu-L-asparaginowego (rys. 6). Spektrum substratowe i właściwości tego enzymu ograniczają się do tych reakcji. Teoretycznie istnieje zatem możliwość wykorzystania karboksymetylohydantoinazy do biotechnologicznej produkcji kwasu-L-asparaginowego (12).



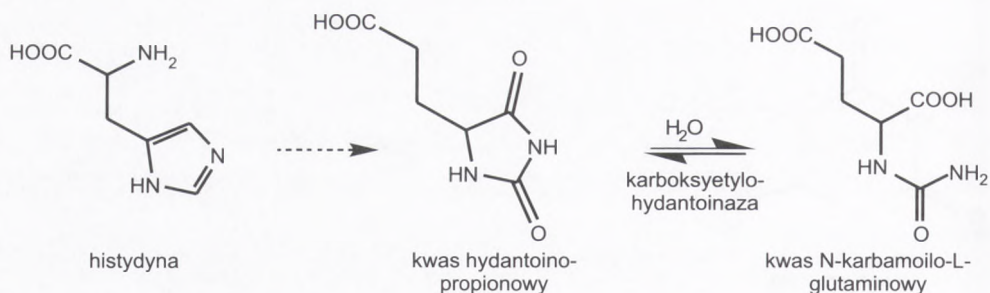
Rys. 5. Fragment szlaku degradacji puryn z udziałem alantoinaz.



Rys. 6. Funkcje karboksymetylohydantoinaz w szlaku degradacji pirymidyn.

7.4. Karboksyetylohydantoinazy (nie ujęte w nomenklaturze EC)

Są to enzymy włączone w szlak degradacji histydyny. Katalizują reakcję hydrolizy kwasu hydantoino-propionowego do kwasu N-karbamilo-L-glutaminowego (rys. 7). Wykazano, że różne mikroorganizmy zawierające karboksyetylohydantoinazę produkowały w 90% czysty enancjomer kwasu-L-glutaminowego z racemicznych



Rys. 7. Fragment szlaku degradacji histydyny z udziałem karboksyetylohydantoinazy.

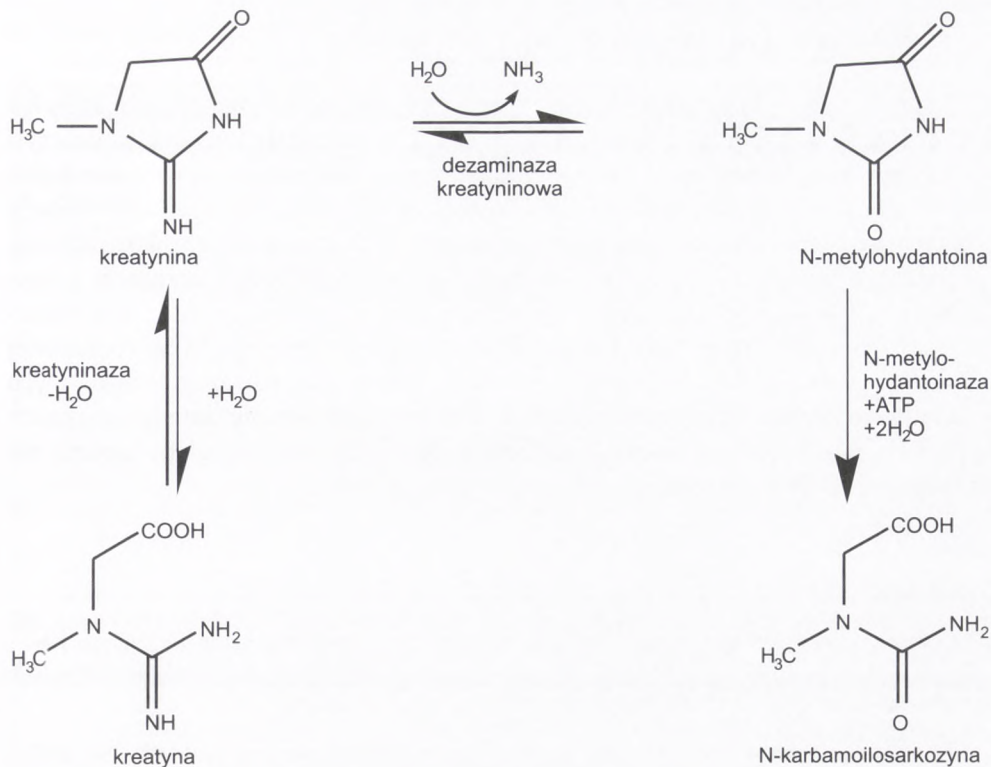
karboksyetylohydantoin. Enancjoselektywność karboksyetylohydantoinazy w tej reakcji nie została dowiedziona. Być może za otrzymanie optycznie czystego kwasu-L-glutaminowego odpowiada drugi enzym, katalizujący hydrolizę *N*-karbamoilo-pochodnej do aminokwasu (12). Ponieważ istnieje dużo tańszych metod otrzymywania kwasu glutaminowego, jak chociażby fermentacja (34), brak jest zastosowań tych enzymów w przemyśle.

7.5. *N*-metylohydantoinazy (*N*-metylohydantoinoamidohydrolazy EC 3.5.2.14)

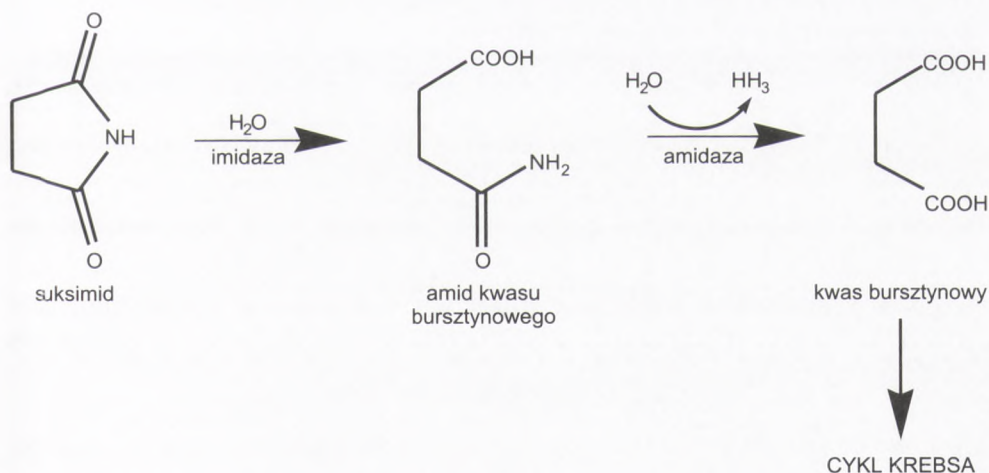
Są to ATP-zależne (34) enzymy hydrolizujące *N*-metylohydantoinę do *N*-karbamoilo-sarkozyny. Reakcja ta jest drugim etapem mikrobiologicznej degradacji kreatyniny (rys. 8) (13). Wykazano, że enzymy te katalizują również ATP zależną hydrolizę hydantoiny oraz D,L-5-monopodstawnych hydantoin. Wobec D,L-5-monopodstawionych hydantoin enzymy te wykazują L-specyficzność, choć ich zastosowanie komercyjne jest ograniczone przez wymagania związane z dostarczeniem odpowiedniej ilości ATP (35). *N*-metylohydantoinazy mogą być zastosowane do analizy zawartości kreatyniny w płynach ustrojowych. Parametr ten jest niezwykle ważny w diagnostyce schorzeń nerek (36,37).

7.6. Imidazy (EC 3.5.2.16)

Imidazy katalizują reakcję hydrolizy suksimidu do amidu kwasu bursztynowego (33). Dalsza przemiana amidu za pomocą amidazy doprowadza do powstania kwasu bursztynowego, który zostaje włączony do cyklu Krebsa (rys. 9). Imidazy posiadają szerokie spektrum substratowe – począwszy od różnych imidów poprzez dihydropiryminy, na hydantoinie skończywszy. W odróżnieniu od dihydropiryminaz enzymy te nie hydrolizują D,L-5-monopodstawionych hydantoin, nie mogą być zatem wykorzystane do syntezy optycznie czynnych aminokwasów. Różnice w budowie podjednostek, składzie oraz specyficzności substratowej wskazują na odmienność od pozostałych hydantoinaz (12).



Rys. 8. Funkcja *N*-metylohydantoinazy w metabolizmie kreatyny.



Rys. 9. Metabolizm suksimidu z udziałem imidazy.

8. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Omówione w tym artykule enzymy z grupy hydantoinaz mogą znaleźć szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, jako narzędzie otrzymywania czystych L- lub D-aminokwasów, dlatego prowadzi się badania mające na celu udoskonalenie i poszerzenie ich spektrum zastosowań. Prowadzone są prace nad izolacją i otrzymywaniem rekombinowanych i termostabilnych enzymów (25). Prowadzenie procesów w podwyższonej temperaturze może zwiększać rozpuszczalność i racemizację hydantoin. Otrzymywanie rekombinowanych enzymów może obniżyć koszty tych biokatalizatorów zwiększając konkurencyjność metody hydantoinazowej (38). W przyszłości, dzięki poznaniu struktury tych enzymów oraz spokrewnionych z nimi karbamyłaz i racemaz będzie możliwe zaprojektowanie zmodyfikowanych enzymów o większej stabilności i stereoselektywności, które mogłyby znaleźć zastosowanie w biotechnologii.

Literatura

1. Faber K., (1997), *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1-8.
2. Viesturs U. E., Szmita I. A., Żilewicz A. W., (1992), *Biotechnologia. Substancje biologicznie czynne, technologia i aparatura*, WNT, Warszawa, 134-140.
3. Hruby V. J., (1993), *Biopolymers*, 33, 1073-1082.
4. Rozhavskaia-Arena M., Lee W. D., Leinung C. M., Grasso P., (2000), *Endocrinology*, 141(7), 2501-2507.
5. Janiec W., Krupińska J., (1999), *Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji*, PZWL, Warszawa, 538-544.
6. Teplan I., (1989), *Acta Biol. Hung.*, 40(1-2), 3-36.
7. Reissmann T., Schally A. V., Bouchard P., Riethmüller H., Engel J., (2000), *Hum. Reprod. Update*, 6(4), 322-331.
8. Sharma R., Vohra R. M., (1999), *Curr. Sci.*, 77, 127-136.
9. Lee D. C., Lee S. G., Kim H. S., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 35-40.
10. Hodgson J., (1994), *Biotechnology*, 12, 152-155.
11. Chmiel A., (1991), *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa, 210-212.
12. Syldatk C., May O., Altenbuchner J., Mattes R., Siemann M., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 293-309.
13. Yamada H., Shimizu S., Kim J. M., Shinmen Y., Sakai T., (1985), *FEMS Microbiol. Lett.*, 30, 337-340.
14. Völkel D., Wagner F., (1995), *Ann. NY Acad. Sci.*, 750, 1-9.
15. May O., Siemann M., Pietzsch M., Kiess M., Mattes R., Syldatk C., (1998), *J. Biotechnol.*, 61, 1-13.
16. Ishikawa T., Mukohara Y., Watabe K., Kobayashi S., Nakamura H., (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 265-270.
17. Grifantini R., Pratesi P., Galli G., Grandi G., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 9326-9331.
18. Olivieri R., Fascetti E., Angelini L., Degen L., (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2173-2183.
19. Grifantini R., Galli G., Carpani G., Pratesi C., Frascotti G., Grandi G., (1998), *Microbiology*, 144, 947-954.
20. Meyer P., Runser S., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 109, 67-74.
21. Wilms B., Wiese A., Syldatk C., Mattes R., Altenbuchner J., (2001), *J. Biotechnol.*, 86, 19-30.
22. Nozaki H., Takenaka Y., Kira I., Watanabe K., Yokozeki K., (2005), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 32, 213-218.
23. Ragnitz K., Pietzsch M., Syldatk C., (2001), *J. Biotechnol.*, 92, 179-186.

24. Röhm, (1995), Eupergit: Immobilisation of enzymes on Eupergit C and Eupergit C 250 L. Product Inform.
25. Burton S., Dorrington A., (2004), *Tetrahedron*, 15, 2737-2741.
26. Pietzsch M., Wiese A., Ragnitz K., Wilms B., Altenbuchner J., Mattes R., Syltatk C., (2000), *J. Chromatogr. B.*, 737, 179-186.
27. Aranaz I., Ramos V., de la Escalera S., Heras A., (2003), *Biocat. Biotrans.*, 21, 349-356.
28. Abenroth J., Niefind K., Schomburg D., (2002), *J. Mol. Biol.*, 320, 143-156.
29. Naguib F. N. M., Kouni M. H., Cha S., (1985), *Cancer Res.*, 45, 5404-5412.
30. Hasinoff B. B., Venkataram S., Singh M., Kuschak T. I., (1994), *Xenobiotica*, 24, 977-987.
31. van Gennip A. H. Abeling N. G. G. M., Vreken P., Kuilenburg A. B. P., (1997), *J. Inherited Metab. Dis.*, 20, 203-213.
32. Runser S., Meyer P. C., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 213, 1315-1324.
33. Ogawa J., Soong C. L., Honda M., Shimizu S., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 243, 322-327.
34. Soda K., Tanaka H., Esaki N., (1983), in: *Biotechnology*, Eds. Rehm H. J., Reed G., 3, 479-530, Verlag Chemie, Weinheim.
35. Ogawa J., Kim J. M., Nirdnoy W., Amano Y., Yamada H., Shimizu S., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 229, 284-290.
36. Siedel J., Deeg R., Röder A., Ziegenhorn J., Möllering H., Gauhl H., (1985), German Patent 3406770 A1, Boehringer Mannheim GmbH.
37. Shumacher G., Burtscher H., Möllering H., (1992), Eur Patent 0464832 A2, Boehringer Mannheim GmbH.
38. Chao Y. P., Chiang C. J., Lo T. E., Fu H., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 348-353.