

# Kapsułkowanie immobilizowanych *in situ* endolipaz *Mucor*

Tadeusz Antczak<sup>1</sup>

Joanna Bugla<sup>2</sup>

Wiesław Szeja<sup>2</sup>

Edward Galas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

<sup>2</sup>Katedra Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej

Politechnika Śląska

Gliwice

## 1. Wstęp

Metody enzymatyczne i chemoenzymatyczne znajdują szerokie zastosowanie w syntetycznej chemii organicznej (1-3). Do najbardziej efektywnych biokatalizatorów stosowanych w syntezie organicznej należą lipazy [EC 3.1.1.3] (4-6). Wykazują one aktywność zarówno w środowisku wodnym jak i rozpuszczalników organicznych. Stosowane są w reakcjach hydrolizy lub estryfikacji, np. do kinetycznego rozdziału racematów, modyfikacji tłuszczów, a także do otrzymywania różnorodnych substancji biologicznie aktywnych. Reakcje prowadzi się z użyciem natywnych enzymów pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego. Lipazy mogą występować w postaci rozpuszczalnej lub, częściej, immobilizowanej (7-11).

Enzymy immobilizowane — w tym i lipazy — wykazują szereg zalet, a do najważniejszych należą: możliwość wielokrotnego stosowania oraz znaczne uproszczenie metodyki wydzielania produktów. Niestety, w wyniku unieruchomienia niejednokrotnie obserwuje się zmniejszenie selektywności i aktywności enzymów. Wybór metody immobilizacji i, co za tym idzie, ostateczna forma enzymu, w wielu przypadkach narzuca ograniczenia jego praktycznego zastosowania. Przykładowo metody sorpcji na nośnikach nie zabezpieczają enzymu przed degradacją mikrobiologiczną, z kolei kopolimeryzacja hamuje dyfuzję powstającej wody w procesie syntezy, co ogranicza stosowanie lipaz w rozpuszczalnikach organicznych (12).

Endolipazy związane ze strukturami komórkowymi drobnoustrojów wykazują znacznie większą aktywność niż enzymy wydzielone w czystej postaci.

W wielu pracach (13-16) wykazano, że lipazy immobilizowane *in situ* mogą być z powodzeniem stosowane w reakcjach hydrolizy i estryfikacji. Ograniczeniem stosowania wewnątrzkomórkowych lipaz w postaci immobilizowanych *in situ* preparatów mycelialnych jest ich niewielka wytrzymałość mechaniczna, co znacznie utrudnia ich wielokrotne wykorzystanie.

Celem podjętych badań było opracowanie metody kapsułkowania endolipaz *Mucor* immobilizowanych *in situ* w celu otrzymania biokatalizatorów aktywnych i stabilnych w środowisku niewodnym. Wybrano nie opisaną dla lipaz technikę kapsułkowania w hydrofilowych żelach alginianowych i karagenianowych. Metoda ta jest szeroko stosowana do otrzymywania immobilizowanych enzymów i drobnoustrojów katalizujących przemiany w środowisku wodnym. Zamiarem naszym była ocena zakresu jej stosowania w rozpuszczalnikach organicznych.

## 2. Metodyka badań

### 2.1. Materiał biologiczny

W badaniach stosowano endolipazy *Mucor javanicus* T45 (M.j.) i *Mucor racemosus* A37 (M.r.) immobilizowane *in situ*, w postaci odwodnionego mycelium. Otrzymywano je za pomocą opisanej metody w pracach (14,17,18). Lipazy stosowano w formie natywnej oraz poddano impregnacji kwasem oleinowym. Do 250 mg lipazy dodawano 4 cm<sup>3</sup> 0,885 M kwasu oleinowego w eterze naftowym. Po 30 minutach impregnacji enzym przemywano kilkakrotnie eterem naftowym i suszono w temperaturze 37°C.

### 2.2. Kapsułkowanie lipaz w alginianie

Lipazę w ilości 250 mg dodano do 10 cm<sup>3</sup> 1% roztworu alginianu sodu (prod. Aldrich, o lepkości 3% roztworu wodnego 200-400 cps) i sieciowano jonami wapnia przez wkraplanie do 30 cm<sup>3</sup> 2% roztworu CaCl<sub>2</sub>. Czas kondycjonowania wynosił 30 min. Następnie otrzymane kapsułki odsączono i przemyto wodą. Tak uzyskany biokatalizator stosowano w reakcji hydrolizy. Lipazy używane w reakcjach syntezy poddawano suszeniu przez 18 godzin w temperaturze 37°C.

### 2.3. Kapsułkowanie lipaz w karagenianie

Kapsułkowanie w karagenianie (typ I, prod. Sigma) prowadzono analogicznie jak kapsułkowanie w alginianie. Stosowanymi czynnikami sieciującymi były: 2,2% KCl i 2% CaCl<sub>2</sub>. Dalej tak jak w pkt. 2.2.

## 2.4. Warunki prowadzenia reakcji hydrolizy i syntezy

Reakcje prowadzono w szczelnie zamkniętych naczyniach o pojemności 30 cm<sup>3</sup> mieszanych z szybkością 225 min<sup>-1</sup> w temperaturze 37°C. Postęp reakcji określano metodą alkalimetryczną oznaczając kwas tłuszczowy (14). Reakcje syntezy przeprowadzono w obecności adsorbenta wody (sito molekularne 4 Å lub Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 2.4.1. Synteza oleinianu butylu

W naczyniu umieszczano: 2 mmol kwasu oleinowego, 2 mmol 1-butanolu, 5 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika, 1 g substancji wiążącej wodę oraz lipazę kapsułkowaną według pkt. 2.2 i 2.3.

### 2.4.2. Hydroliza oliwy z oliwek

Reakcje hydrolizy prowadzono w naczyniach jw. w układzie dwufazowym używając: 0,5 cm<sup>3</sup> oliwy, 5 cm<sup>3</sup> eteru naftowego, 0,5 cm<sup>3</sup> wody i lipazę kapsułkowaną według pkt. 2.2 i 2.3.

## 3. Wyniki

Aktywność w środowisku niewodnym jest wypadkową oddziaływania enzymu z elementami otoczenia, z których znaczącą rolę odgrywają dwa składniki fazy ciekłej: rozpuszczalnik organiczny i woda (10). Znaczenie wody jest szczególnie ważne w przypadku reakcji estryfikacji katalizowanej przez lipazy, gdyż jest ona zarówno niezbędnym składnikiem środowiska reakcji jak i jednym z jej produktów, którego stężenie wzrasta podczas syntezy estru. Wydzielona woda w środowisku hydrofobowym może: wysyczać rozpuszczalnik (po wysyceniu tworzyć odrębną fazę), lokalizować się w rejonach hydrofilowych (np. nośnik enzymu, substrat, produkt) lub oddziaływać bezpośrednio z lipazą. Woda ta może w sposób pośredni lub bezpośredni wpływać na aktywność lipazy: zmieniać kierunek reakcji z syntezy na hydrolizę, zwiększać szybkość syntezy estru lub inaktywować lipazę.

Lipazy *Mucor* immobilizowane *in situ* w środowisku niewodnym wykazują bardzo wysoką termostabilność. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze 100°C w rozpuszczalnikach organicznych [log P z przedziału 2-4,5] (19), zachowują 82-87% aktywności wyjściowej (13,20). Ich aktywność jest także uzależniona od budowy syntezowanego estru (14).

W „preferowanym” dla badanych enzymów zakresie log P poszukiwano optymalnego rozpuszczalnika organicznego, w którym kapsułkowane lipazy *Mucor* wykazywały najwyższą aktywność katalityczną w reakcji syntezy oleinianu butylu. W związku z tym, że lipazy kapsułkowano w matrycy hydrofilowej to także optymalizowano czynnik wiążący wodę.

Na aktywność syntetyczną immobilizowanych *in situ* lipaz *Mucor* wywiera wpływ woda wydzielona w reakcji syntezy. Jej okresowe zaleganie w komórce może być powodem przebiegu reakcji rewersji (14). Zjawisko to mogłoby występować zwłaszcza w przypadku kapsułkowania lipaz w hydrofilowym żelu alginianowym i karagenianowym. Prowadząc syntezę wymuszano dyfuzję powstałej wody poza kapsułkę przez zastosowanie czynnika wiążącego wodę, co zapobiegało zmianie kierunku przemiany katalizowanej przez lipazę. Taki sposób prowadzenia reakcji umożliwia odpowiedź na pytanie: czy lipaza po kapsułkowaniu zachowuje niezmienną konformację katalityczną? Odpowiedź na nie była szczególnie ważna, ponieważ pomimo suszenia po kapsułkowaniu preparatów lipazy, hydrofilowy charakter matrycy stwarzał niebezpieczeństwo zatrzymywania wydzielonej wody, co tworzyłoby środowisko preferujące aktywność hydrolityczną enzymu. W takim środowisku brak postępów reakcji estryfikacji mógł być interpretowany jako inaktywacja biokatalizatora.

Wydajności syntezy oleinianu butylu katalizowanego przez natywną lipazę *M. javanicus* zamieszczono w tabeli 1.

TABELA 1

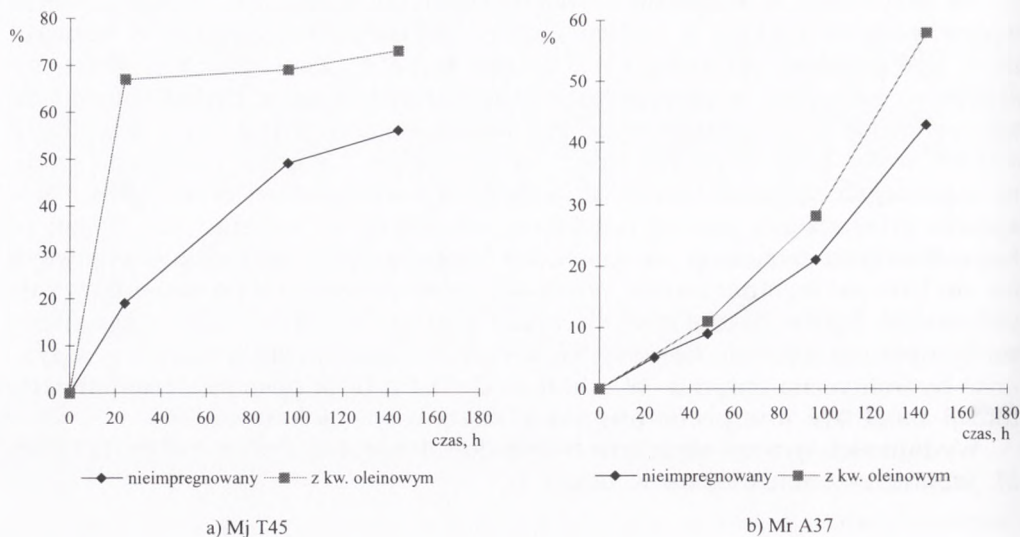
WPLYW RODZAJU ROZPUSZCZALNIKA ORAZ CZYNNIKA WIĄZĄCEGO WODĘ NA POSTĘP SYNTAZY OLEINIANU BUTYLU W REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ IMMOBILIZOWANĄ *in situ*, NATYWNĄ LIPAZĘ *Mucor javanicus*

Rozpuszczalnik	Czynnik sorbujący wodę	Czas syntezy (h)		
		24	48	96
		stopień konwersji (%)		
eter di-n-butyłowy	sita mol. 4 Å	42	65	87
eter di-n-butyłowy	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	74	76	75
eter di-izo-propyłowy	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	54	54
eter naftowy	sita mol. 4 Å	76	92	90
eter naftowy	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	89	92	92

Zastosowanie czynnika wiążącego wodę i rozpuszczalnego w niej niesie ze sobą niebezpieczeństwo wniknięcia jego molekuł do warstwy wody niezbędnej lipazy, co z kolei może wpływać na aktywność enzymu. Substancje wnikając w warstwę niezbędnej wody mogą wpływać na aktywność syntetyczną poprzez zmiany pH warstwy lub jej modyfikację chemiczną (15).

Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że optymalnym środowiskiem dla prowadzenia reakcji estryfikacji jest eter naftowy z dodatkiem bezwodnego siarczanu sodu, jako czynnika usuwającego wodę.

Lipazy *Mucor* immobilizowane *in situ* wykazują niewielką stabilność mechaniczną i ulegają nadmiernemu rozdrobnieniu (powstaje trudna do rozdzielenia mieszanina, co uniemożliwia wykorzystanie ich w kolejnych syntezach). Stosowanie endolipaz w procesach ciągłych lub jako wypełnienie reaktora z mieszaniem jest ograniczone. Warunki otrzymywania kapsułkowanych lipaz dobrano w ten sposób, aby zapewnić dobrą wytrzymałość mecha-



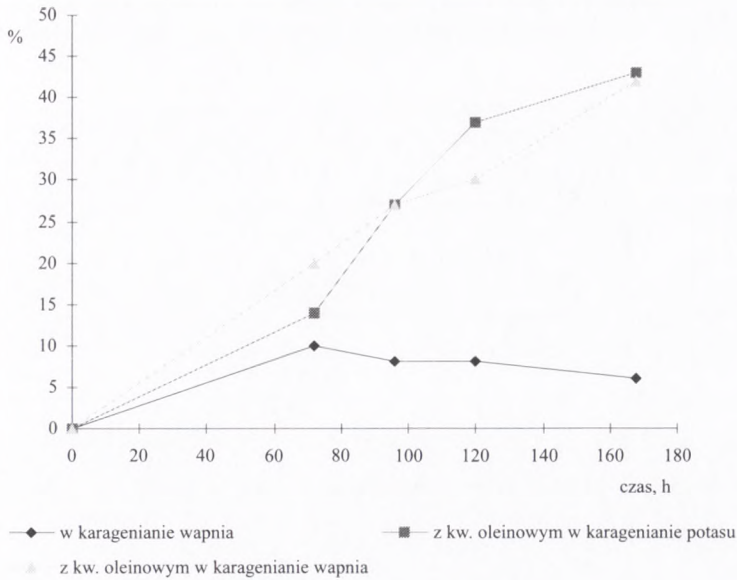
Rys. 1. Wpływ impregnacji kwasem oleinowym immobilizowanych *in situ* lipaz *Mucor* na postęp syntezy oleinianu butylu w reakcji katalizowanej przez enzymy kapsułkowane w alginianie wapnia.

niczną (w warunkach, w których były prowadzone badania) przy minimalnej zawartości jonów sieciujących, gdyż można się było spodziewać, że stopień usieciowania wpływa na szybkość dyfuzji, a przez to również na szybkość reakcji estryfikacji. Dobrano zatem minimalny czas kondycjonowania pozwalający osiągnąć założony cel.

Lipazy *Mucor* inkludowano w żelu alginianu wapnia, a następnie odwadniano uformowane granulki. Stwierdzono, że tak otrzymane enzymy zapewniają w temperaturze 37°C wysoki stopień konwersji substratów. Nie stwierdzono wpływu zmiany czasu suszenia preparatów na efektywność działania lipaz.

W pracy (14) stwierdzono zbliżone szybkości reakcji estryfikacji kwasu oleinowego alkoholem butylowym oraz hydrolizy trioleinianu glicerolu katalizowanych przez lipazy *Mucor*. Wynikało to prawdopodobnie z podobnej zdolności enzymów do rozpoznawania łańcucha kwasu oleinowego w substratach. Właściwość tę wykorzystano podczas otrzymywania kapsułkowanych lipaz w celu zabezpieczenia i stabilizacji ich konformacji katalitycznej podczas formowania kapsułek. Przeprowadzono dwustopniową modyfikację enzymów. Najpierw lipazy impregnowano kwasem oleinowym by, po odmięciu jego nadmiaru, przeprowadzić operację kapsułkowania. Uzyskane rezultaty zamieszczono na rysunku 1.

W przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że enzymy łączone z substratem, a następnie inkludowane w polimer wykazują większą efektywność katalityczną. Kapsułkowane lipazy charakteryzują się dużą odpornością mechaniczną, a użyte w kolejnych cyklach reakcji nie tracą swej aktywności (tab. 2).



Rys. 2. Postęp reakcji estryfikacji oleinianu butylu katalizowanej przez lipazę *Mucor javanicus* kapsułkowaną w żelu karagenianowym.

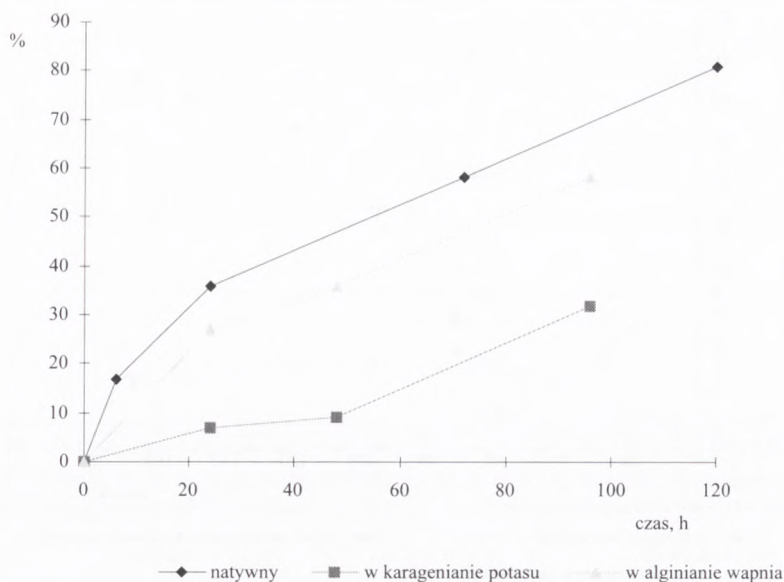
TABELA 2

POSTĘP REAKCJI SYNTETY OLEINIANU BUTYLU KATALIZOWANEJ PRZEZ LIPAZY *Mucor* PROWADZONEJ W DWÓCH CYKLACH DLA ENZYMOW NIEIMPREGNOWANYCH I IMPREGNOWANYCH KWASEM OLEINOWYM

Czas (h)	<i>Mucor javanicus</i>				<i>Mucor racemosus</i>			
	nieimpregnowany		impregnowany		nieimpregnowany		impregnowany	
	I cykl	II cykl	I cykl	II cykl	I cykl	II cykl	I cykl	II cykl
	stopień konwersji (%)							
24	19	22	67	43	5	11	—	5
48	—	22	—	56	9	28	11	17
96	49	—	69	—	21	—	28	—
120	—	47	—	86	—	30	—	31
144	56	—	73	—	43	—	58	—
168	—	59	—	88	—	36	—	41

Zaobserwowany w kolejnych cyklach dla wielu przypadków estryfikacji, wzrost aktywności kapsułkowanej lipazy jest prawdopodobnie wynikiem postępującego procesu formowania porów żelu. Jest to zjawisko korzystne ponieważ umożliwia swobodną dyfuzję substratów i produktów przy jednocześnie zachowanej dużej wytrzymałości mechanicznej kapsułek.

Powszechnie wiadomo, że jony wapniowe są aktywatorami wielu enzymów. Zbadano wpływ jonów sieciujących żel karagenianu na działanie katalityczne lipazy. Roztwór polisacharydu z zawieszonym w nim enzymem sieciowano jo-



Rys. 3. Postęp reakcji hydrolizy oliwy z oliwek katalizowanej przez lipazę *M. racemosus*.

nami potasu lub wapnia. Na podstawie otrzymanych wyników dla lipazy *M. javanicus* (rys. 2) można stwierdzić, że decydujący wpływ na efektywność działania kapsułkowanych lipaz wywiera impregnacja lipazy kwasem oleinowym.

W wyniku opracowanej metody zamykania lipaz w kapsułkach żelów alginianowych i karagenianowych oraz suszenia otrzymano preparaty, które mogą być stosowane w reakcjach syntezy estrów. Przeprowadzono także próby zastosowania niesuszonych kapsułkowanych lipaz *M. racemosus* do hydrolizy oleju oliwkowego (rys. 3). Lipazy kapsułkowane w alginianie wapnia wykazują większą aktywność w porównaniu z kapsułkowanymi w karagenianie potasu. O aktywności hydrolitycznej w środowisku wodnym decydujący jest wymiar porów kapsułek umożliwiających dostęp acyloglicerolu do inkludowanej lipazy.

#### 4. Podsumowanie

Zaproponowana metoda kapsułkowania lipaz w hydrofilowych żelach polisacharydów: alginianie wapnia i karagenianie potasu polega na inkludowaniu w sieć polimeru impregnowanych kwasem oleinowym immobilizowanych *in situ* lipaz *Mucor*. Zastosowany czas kondycjonowania oraz stężenie roztworów sieciujących pozwoliły otrzymać preparaty aktywne w reakcji hydrolizy acylogliceroli, które po wysuszeniu w temperaturze 37°C wykazują także wysoką aktywność w reakcji syntezy estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych. Metoda ta jest prosta w wykonaniu i tania. Pozwala ona uzyskać aktywne w dłuższym czasie biokatalizatory, które cechuje duża wytrzy-

małość mechaniczna, co umożliwi ich użycie do wielokrotnego stosowania w procesach okresowych i ciągłych.

## Literatura

1. Drauz K., Waldmann H., (1995), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH, Weinheim, vol. 1, 165-363.
2. Whitesides G. M., Wong C.-H., (1985), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 617-638.
3. Faber K., (1997), *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
4. Boland W., Frossl C., Lorenz M., (1991), *Synthesis*, 1049-1072.
5. Chen C.-S., Sih J. H., (1989), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 695-707.
6. Haliniarz E., Lejczak B., (1996), *Wiad. Chem.*, 50, 193-211.
7. Malcata X. F., Reyes H. R., Garcia H. S., Hill Jr. Ch. G., Amundson C. H., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 426-446.
8. *Lipases*, (1994), Eds. Woolley P., Petersen S.B., Cambridge University Press.
9. Adamczak M., Bednarski W., (1994), *Biotechnologia*, 4(27), 139-153.
10. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 1(11), 62-70.
11. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 8, 95-110.
12. Szewczuk A., Rapak A., (1985), *Wiad. Chem.*, 31(39), 31-84.
13. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 1(20), 59-67.
14. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2(29), 82-91.
15. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.
16. Antczak T., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2(29), 73-81.
17. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1989), Patent nr 150601.
18. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1989), Patent nr 150604.
19. Laane C., Boren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
20. Antczak T., Mrowiec-Białoń J., Bielecki S., Jarzębski A.B., Malinowski J.J., Lachowski A. I., Galas E., (1997), *Biotechnology Techniques*, 11, 9-11.

## Encapsulation of immobilised *in situ* intracellular lipases of *Mucor*

### Summary

Endolipases associated with the cell structures of microorganisms are more active in comparison with purified enzymes. Due to the weak mechanical resistance lipases immobilised *in situ* cannot be used many times.

The method of lipases encapsulation in polysaccharides hydrophilic gels was elaborated. The lipases *Mucor* immobilised *in situ* were treated with oleic acid in hexane and then dispersed in an aqueous solution of sodium alginate or karagenate. Immobilisation of enzymes was achieved by intermolecular cross-linking of the polysaccharide chains using the solution of calcium or potassium salts. The biocatalysts prepared under proposed conditions were active in hydrolysis of esters, as well as in esterification reaction. It was found that immobilised enzymes were active for a long time, were mechanically resistant and could be used many times in periodic and continuous processes.

### Key words:

lipases, immobilization encapsulation, ester hydrolysis, esterification, alginate, karagenate.

### Adres do korespondencji:

Tadeusz Antczak, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.