

# Reakcje enzymatyczne w nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

Janusz J. Malinowski<sup>1</sup>

Andrzej B. Jarzębski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Inżynierii Chemicznej

Polska Akademia Nauk

Gliwice

<sup>2</sup>Wydział Chemiczny, Instytut Inżynierii Chemicznej

Politechnika Śląska

Gliwice

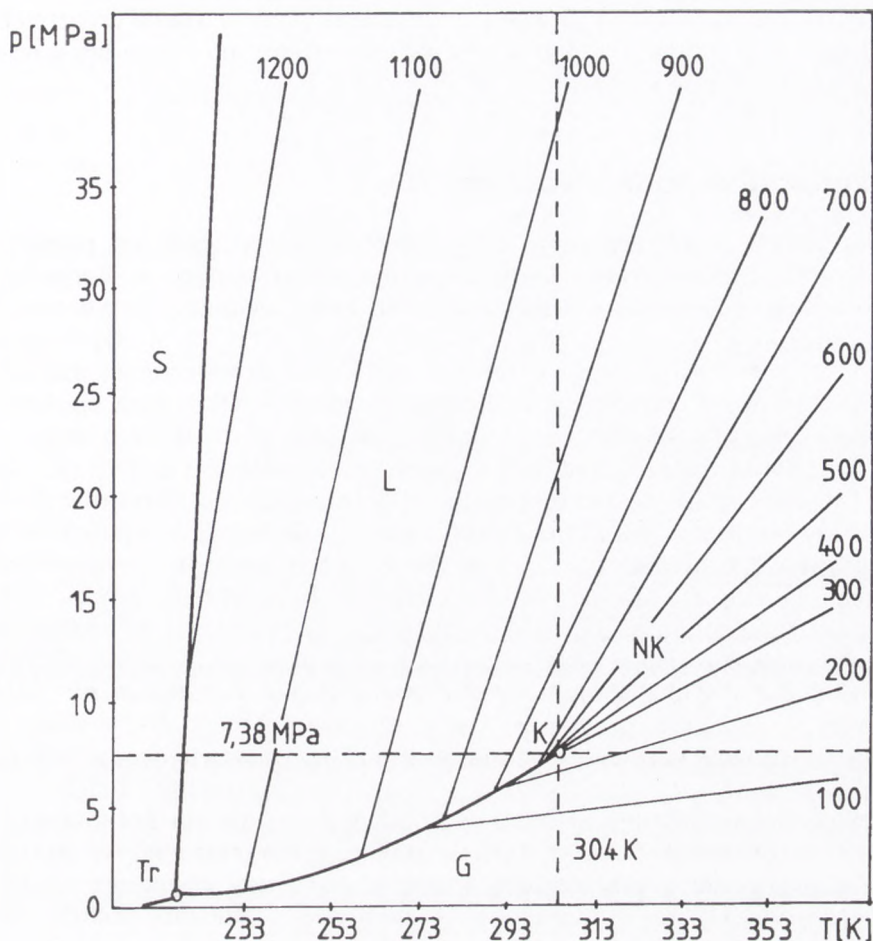
## 1. Wprowadzenie

Zainteresowanie technologiami wykorzystującymi płyny w stanie nadkrytycznym wynika z atrakcyjnych możliwości jakie niesie ta technika, takich jak: użycie nietoksycznych, niepalnych i nie zagrażających środowisku naturalnemu rozpuszczalników (zwykle sprężonego CO<sub>2</sub>), a także łatwość zmiany potencjału rozpuszczalności, niemożliwa w klasycznych układach cieczowych. Płyn w stanie nadkrytycznym, tj. o temperaturze i ciśnieniu powyżej punktu krytycznego (304°K i 7,38 MPa dla CO<sub>2</sub>), cechuje gęstość porównywalna z gęstością rozpuszczalników organicznych, wysoka ściśliwość oraz bardzo niska wartość współczynnika lepkości i wysoka wartość współczynnika dyfuzji. Na rysunku 1 przedstawiono wykres fazowy w układzie p,T dla CO<sub>2</sub> z naniesionymi liniami stałej gęstości w zakresie 100-1200 kg m<sup>-3</sup>. Znaczne zagęszczenie linii stałej gęstości w sąsiedztwie punktu krytycznego powoduje, że stosunkowo niewielkie zmiany temperatury czy ciśnienia skutkują dużymi zmianami gęstości dwutlenku węgla, a zatem jego zdolności rozpuszczania. Z kolei niska lepkość i wysoka dyfuzyjność zwiększając znacząco szybkość procesu transportu masy, wpływają korzystnie na kinetykę procesu.

Enzymy zachowują aktywność katalityczną i stabilność w środowisku niewodnym, a zatem mogą być stosowane jako katalizatory reakcji przebiegających w rozpuszczalnikach organicznych i innych mediach niekonwencjonalnych. Jednym z takich mediów, będących interesującą alternatywą dla rozpuszczalników organicznych są płyny nadkrytyczne, szczególnie dwutlenek węgla.

Podstawowe zalety płynące z przeprowadzania reakcji enzymatycznych w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> to:

- użycie nietoksycznego, obojętnego dla środowiska i taniego rozpuszczalnika,



Rys. 1. Wykres fazowy w układzie p,T dla dwutlenku węgla K — punkt krytyczny).

- niska temperatura procesu (308-333°K),
- nierozpuszczalność białek w rozpuszczalniku, która umożliwia ich separację z mieszaniny reakcyjnej,
- znaczne zmiany rozpuszczalności przy niewielkich zmianach T lub p ułatwiają separację produktów poniżej węzła syntezy,
- możliwość frakcjonowania i oczyszczania produktów reakcji bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej bez konieczności zmiany rozpuszczalnika,
- możliwość mikronizacji produktu reakcji w wyniku gwałtownego rozprężania roztworu nadkrytycznego przez dyszę, jako alternatywa dla rozdrabniania mechanicznego (1),

- brak pozostałości rozpuszczalnika w końcowym produkcie.

Pewnym mankamentem procesu z udziałem płynów nadkrytycznych jest konieczność pracy reaktora pod wysokim ciśnieniem, co wiąże się z relatywnie wysokimi kosztami aparatury.

## 2. Biokataliza w nadkrytycznym CO<sub>2</sub>

Biokataliza w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> bierze swoje początki od pionierskich prac zespołów badawczych z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Berkeley oraz MIT z pierwszej połowy lat osiemdziesiątych, które wykazały aktywność i stabilność enzymów w środowisku nadkrytycznego CO<sub>2</sub> (2,3). Opublikowane dotąd prace nie pozwalają na przedstawienie ogólnej zależności między stabilnością enzymu a ciśnieniem nadkrytycznego CO<sub>2</sub>. Oksydaza cholesterolowa *Gloeocysticum chrysocreas* była stabilnie aktywna w dwutlenku węgla o ciśnieniu 10 MPa i temperaturze 308°K przez co najmniej 50 godzin (4). Kasche i wsp. (5) stwierdzili, że dekompresja CO<sub>2</sub> prowadzi do denaturacji  $\alpha$ -chymotrypsyny, trypsyny i amidazy penicylanowej. Jednym ze sposobów uniknięcia inaktywacji białek enzymatycznych było bardzo wolne rozprężanie medium reakcyjnego. Utrata aktywności enzymów była wyższa, gdy proces prowadzono w nawilżonym CO<sub>2</sub>. Taniguchi i wsp. (6) zauważyli, że biokatalizator lipazowy zawierający 50% wag. wody tracił 60% swej początkowej aktywności po kontakcie z nadkrytycznym dwutlenkiem węgla, natomiast nie zaobserwowano tego efektu w przypadku enzymu zawierającego 5-7% wag. wody. Utratę aktywności wiązano ze zmianami pH w warstwie wody otaczającej enzym, w następstwie rozpuszczania w niej CO<sub>2</sub>. Zagrobelny i Bright w pracy (7) poświęconej trypsynie dowodzi, że negatywny wpływ na konformację białek wywiera proces sprężania CO<sub>2</sub>, a nie jego dekompresji. W przypadku lipazy *Mucor miehei* obniżenie aktywności o 10% przy ciśnieniu 13-18 MPa i temperaturze 313°K (8) następowało dopiero po sześciu dniach. Wzrost temperatury do 333°K przyczyniał się do spadku aktywności o dalsze 10%. Podobny efekt zaobserwowano dla lipazy *Candida cylindracea* (9). Można zatem stwierdzić, że kontakt z nadkrytycznym CO<sub>2</sub> nie wywiera zasadniczo negatywnego wpływu na stabilność badanych enzymów. Zalecane jest zachowanie ostrożności na etapie sprężania i dekompresji, szczególnie przy znacznym nasyceniu enzymów wodą. Wtedy bowiem obserwuje się niekorzystne zmiany strukturalne białek, czy wręcz ich denaturację.

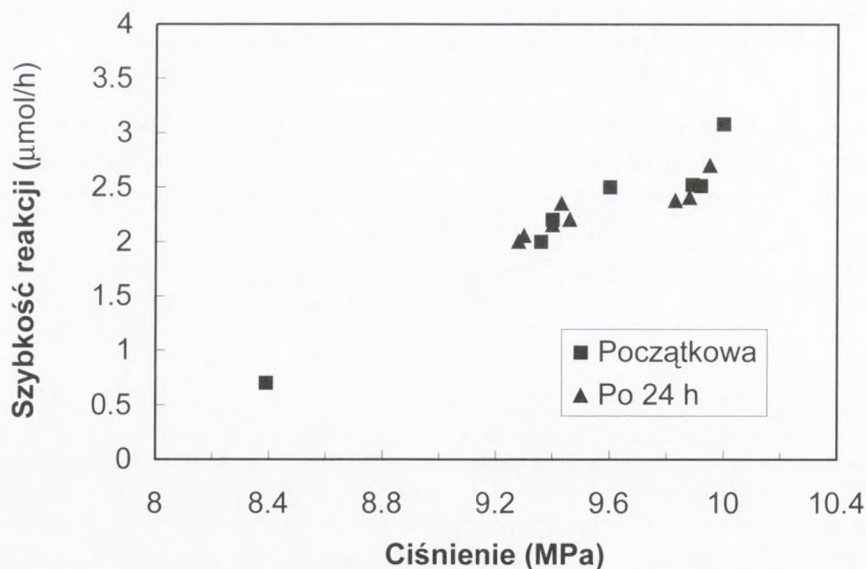
Przykłady kilku modelowych reakcji enzymatycznych przeprowadzonych w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> przedstawiono w tabeli 1. Są to głównie reakcje estryfikacji i transestryfikacji, katalizowane przez lipazy, te enzymy bowiem oraz inne esterazy, są najliczniej reprezentowane w badaniach z udziałem płynów nadkrytycznych, ze względu na ich możliwości zastosowań (produkcja estrów, modyfikacja kwasów tłuszczowych, itd.). Poza tym posiadają one relatywnie prostą budowę, są dobrze poznane, nie wymagają stosowania kofaktorów.

TABELA 1  
PRZYKŁADY MODELOWYCH REAKCJI ENZYMATYCZNYCH W NADKRYTYCZNYM CO<sub>2</sub>

Typ reakcji	Substraty	Enzym
estryfikacja	kwasy oleinowy + etanol	lipaza (8,10,11)
estryfikacja	kwasy mirystynowy + etanol	lipaza (12,13)
transestryfikacja	trioleinian glicerylu + kwas stearynowy	lipaza (14)
alkoholiza	octan etylu + alkohol amylowy/nonylowy	lipaza (15)
alkoholiza	ester chloroetylowy N-acetylo-L-fenylalaniny + etanol	subtylizyna (16)
utlenianie	cholesterol	oksydaza cholesterolowa (4,17)
hydroliza	fosforan <i>p</i> -nitrofenylu	fosfataza (2)

W biokatalizie w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> stosuje się typowe rozwiązania bio-reaktorów takie jak: reaktor okresowy (autoklaw bez mieszadła, autoklaw z mieszadłem, kolumna), półokresowy (złożenie biokatalizatora z ciągłym przepływem CO<sub>2</sub>) oraz reaktor przepływowy. Typowe objętości reaktorów w instalacjach doświadczalnych to 1-500 ml; są doniesienia o instalacjach pilotowych z reaktorem o objętości kilku litrów (15). W przeważającej większości badań stosowano enzymy unieruchomione na różnego typu nośnikach. Spośród różnych typów reaktorów, najlepszym rozwiązaniem, jak się wydaje, jest kolumna ze złożem biokatalizatora. W tego typu reaktorze nie zachodzi bowiem potrzeba stosowania dość złożonego technicznie rozwiązania jakim jest mieszanie mechaniczne w zbiorniku wysokociśnieniowym. Regulacja mieszania realizowana jest w kolumnie poprzez zmianę natężenia przepływu nadkrytycznego CO<sub>2</sub>. Ponadto obniżenie aktywności w wyniku dekompresji można zminimalizować utrzymując stałe ciśnienie na kolumnie między kolejnymi szarżami.

Większość dostępnych danych literaturowych wskazuje na wzrost szybkości reakcji przy zamianie środowiska reakcji z wodnego czy organicznego na nadkrytyczny CO<sub>2</sub>. Szybkość utleniania cholesterolu przez oksydazę cholesterolową w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> przy ciśnieniu 10 MPa była 75 razy większa niż w roztworze wodnym z dodatkiem buforów (17). W reakcji alkoholizy N-acetylo-L-fenylalaniny w nadkrytycznym CO<sub>2</sub>, przy udziale subtylizyny obserwowano czterokrotny wzrost szybkości reakcji w porównaniu do reakcji przebiegającej w alkoholu amylowym (16). Podobny efekt przy zamianie środowiska reakcji z heksanu na dwutlenek węgla stwierdzono dla reakcji trójoleinianu glicerylu z kwasem stearynowym katalizowanej przez lipazę (18). Charakterystykę kilku wybranych reakcji enzymatycznych przedstawiono w tabeli 2. Przytoczone parametry reakcji są relatywnie wysokie jak dla procesów biotechnologicznych.



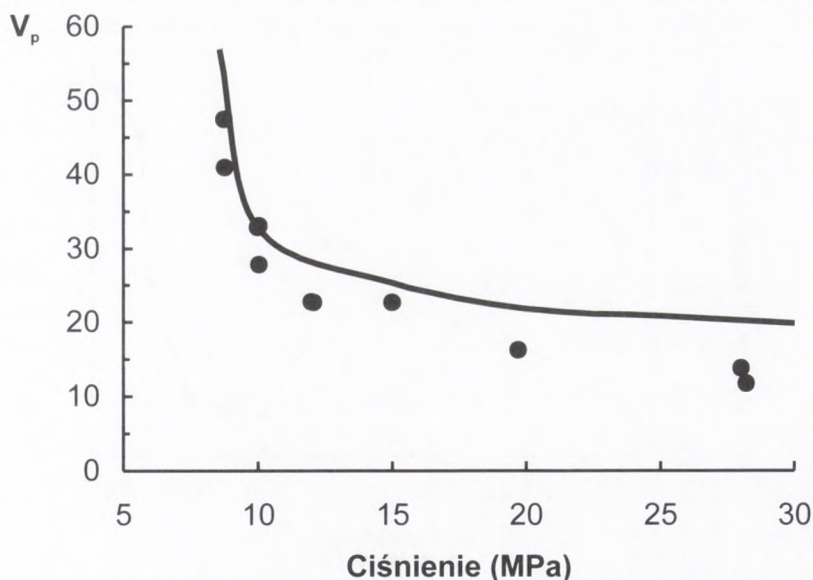
Rys. 2. Wpływ ciśnienia nadkrytycznego CO<sub>2</sub> na szybkość reakcji utleniania cholesterolu przez oksydazę cholesterolową (17).

TABELA 2

CHARAKTERYSTYKI WYBRANYCH REAKCJI ENZYMATYCZNYCH W NADKRYTYCZNYM CO<sub>2</sub>

Szybkość reakcji	Wydajność
2 M/kg lipazy/h (alkoholiza: octan etylu + alkohol amyłowy) (15)	60-80% (utlenianie cholesterolu) (4)
50 M/kg lipazy/h (transestryfikacja: trioleinian glicerolu + kwas stearynowy) (18)	65% (konwersja fosforanu nitrofenylu do nitrofenolu) (2)
11 M/kg lipazy/h (estryfikacja: kwas oleinowy + alkohol etylowy) (8)	75% (transestryfikacja: trioleinian glicerylu + kwas stearynowy) (18)
	95% (estryfikacja: kwas oleinowy + alkohol etylowy) (11)

Jednym z ważnych czynników wpływających na przebieg reakcji enzymatycznych w mediach nadkrytycznych jest ciśnienie. Randolph i wsp. (17) stwierdzili pozytywny wpływ ciśnienia w zakresie 8-10 MPa na szybkość reakcji utleniania cholesterolu (rys. 2); wytłumaczyli to wzrostem rozpuszczalności substratu (cholesterolu) ze wzrostem ciśnienia CO<sub>2</sub>. Z kolei inni badacze (19) zaobserwowali negatywny wpływ ciśnienia CO<sub>2</sub>, szczególnie w pobliżu punktu krytycznego, na szybkość reakcji transestryfikacji triacylogliceroli, katalizowanej przez lipazę *Rhizopus arrhizius* (rys. 3). Zjawisko to utożsamiali oni z niekorzystnym dla przebiegu reakcji współczynnikami po-

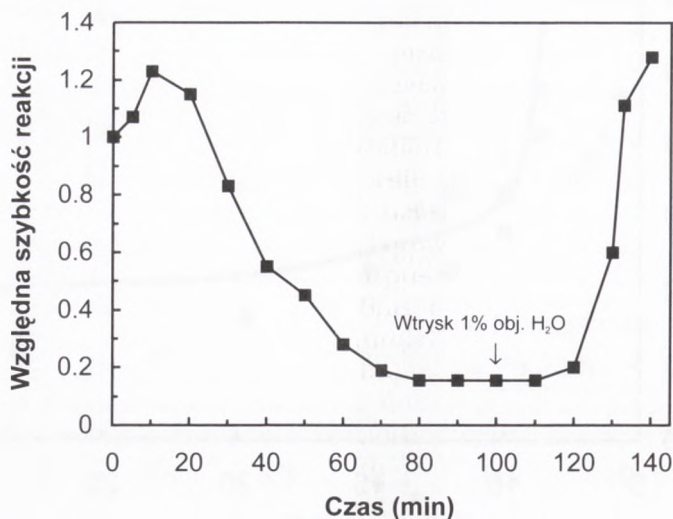


Rys. 3. Wpływ ciśnienia na szybkość reakcji transestryfikacji triacylogliceroli w nadkrytycznym CO<sub>2</sub> (19).

działu reagentów między fazę nadkrytyczną a biokatalizator. Wpływ ciśnienia, jak widać, jest niejednoznaczny i różnicowany w zależności od typu reakcji, reagentów itd.

Zawartość wody w układzie reakcyjnym ma znaczący wpływ na przebieg reakcji w mediach niekonwencjonalnych z uwagi na jej niezbędność dla utrzymania aktywnej konformacji enzymów. Tytułem przykładu można przytoczyć wyniki pionierskiej pracy Randolpha i wsp. (17), w której autorzy stwierdzili gwałtowny spadek aktywności oksydazy cholesterolowej podczas przepływu suchego dwutlenku węgla nad wilgotnym złożem biokatalizatora. Enzym odzyskiwał początkową aktywność po wstrzyknięciu do układu wody (rys. 4). Na podstawie szeregu prac można stwierdzić, że optymalna zawartość wody w matrycy wynosi 4-10% wag. (8,10). Dwutlenek węgla powinien również zawierać wodę w stężeniu od 0,1% wag. do poziomu nasycenia, tj. ok. 0,3% wag. Istotny jest ponadto współczynnik podziału wody między matrycę zawierającą enzymy a nadkrytyczny CO<sub>2</sub>. Wyniki szczegółowych badań tego zagadnienia przedstawiono w pracach (10,15).

Kolejnym czynnikiem wpływającym na przebieg reakcji enzymatycznych jest dodatek modyfikatorów do dwutlenku węgla. Mogą one powodować korzystny wzrost rozpuszczalności substratów w rozpuszczalniku. Randolph i wsp. (4) przedstawili wyniki szczegółowych badań tego zagadnienia w reakcji utleniania cholesterolu. Dodanie do CO<sub>2</sub> niewielkiej ilości niektórych rozpuszczalników organicznych (np. metanolu) powodowało znaczący wzrost rozpuszczalności cholesterolu. Obserwowany wzrost szybkości reakcji po dodaniu niektórych modyfikatorów, autorzy cytowanych badań przypisali jed-



Rys. 4. Wpływ dodatku wody na szybkość reakcji utleniania cholesterolu w nadkrytycznym  $\text{CO}_2$  (17).

nakże innym czynnikiem niż wzrost rozpuszczalności substratu. Przykładowo, dodatek np. *tert*-butanolu, zwiększający nieznacznie rozpuszczalność cholesterolu, przyspieszał kilkakrotnie szybkość reakcji. Okazało się, że dodatek pewnych związków organicznych powoduje wzrost stężenia agregatów cholesterolu, których obecność polepsza proces wymiany masy, a w konsekwencji kinetykę reakcji.

Jednym z bardziej interesujących rozwiązań procesowych jest uzyskiwanie optycznie czystych izomerów (20-22). Rantakylä i Aaltonen (20) przeprowadzili enacjoselektywną estryfikację ibuprofenu w nadkrytycznym  $\text{CO}_2$  katalizowaną przez lipazę *Mucor miehei*. Ibuprofen, niesteroidowy środek przeciwzapalny, stosowany jest w postaci mieszaniny racemicznej, przy czym jedynie enacjomer S wykazuje aktywność biologiczną. Proces prowadzony w  $\text{CO}_2$  pozwolił na uzyskanie 70% nadmiaru estru ibuprofenu w formie S, przy 15-20% konwersji. Z kolei w procesie estryfikacji glicydu, katalizowanego przez lipazę z trzustki wieprzowej, uzyskano 83% nadmiar enacjomeru w formie S przy 25-30% konwersji (21). Porównanie parametrów reakcji enzymatycznych w nadkrytycznym  $\text{CO}_2$  i rozpuszczalnikach organicznych wskazuje, że uzyskane wydajności są podobne. Istotną zaletą zastosowania mediów nadkrytycznych jest możliwość zintegrowania procesów reakcji i separacji oraz uzyskanie końcowego produktu nie zanieczyszczonego śladowymi ilościami rozpuszczalnika (11,23,24).

### 3. Podsumowanie

Podsumowując można stwierdzić, że reakcje enzymatyczne można z powodzeniem prowadzić w mediach niekonwencjonalnych, w tym w dwutlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Technika ta wychodzi naprzeciw dominującym tendencjom ograniczenia stosowania często toksycznych rozpuszczalników organicznych i zastąpieniu ich efektywnymi, nieszkodliwymi zamiennikami, obojętnymi dla środowiska naturalnego. Badania z zakresu biokatalizy, prowadzone jak dotąd w skali laboratoryjnej, dostarczają interesujących wyników. Przemysłowa realizacja procesów biokatalizy w środowisku płynów nadkrytycznych, jak się wydaje, jest jeszcze dość odległa. Zasadnicze ograniczenia leżą po stronie ekonomii, a nie techniki, technologie te są bowiem dość drogie, głównie ze względu na znaczny koszt aparatury. Realna szansa na ich przemysłowe zastosowanie istnieje tylko w odniesieniu do produktów drożych, których uzyskanie tradycyjnymi metodami jest bardzo utrudnione lub wręcz niemożliwe.

### Literatura

1. Larson K. A., King M. L., (1986), *Biotechnol. Prog.*, 2, 73-82.
2. Randolph T. W., Blanch H. W., Prausnitz J. M., Wilke C. R., (1985), *Biotechnol. Lett.*, 7, 325-328.
3. Hammond D. A., Karel M., Klibanov A. M., Krukonis V. J., (1985), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11, 393-400.
4. Randolph T. W., Clark D. S., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1988), *Science*, 239, 387-390.
5. Kasche V., Schlothauer R., Brunner G., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 569-574.
6. Taniguchi M., Kamihira M., Kobayashi T., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 593-594.
7. Zagrobelny J., Bright F. V., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 421-423.
8. Marty A., Chulalaksananukul W., Condoret J. S., Willemot R. M., Durand G., (1990), *Biotechnol. Lett.*, 12, 11-16.
9. Yu Z. R., Rizvi S. S. H., Zollweg J. A., (1992), *Biotechnol. Prog.*, 8, 508-513.
10. Marty A., Chulalaksananukul W., Willemot R. M., Condoret J. S., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 273-280.
11. Marty A., Combes D., Condoret J. S., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 497-504.
12. Knez Ž., Rižner V., Habulin M., Bauman D., (1995), *JAOCS*, 72, 1345-1349.
13. Habulin M., Krmelj V., Knez Ž., (1996), *J. Agric. Food Chem.*, 44, 338-342.
14. Nakamura K., Chi Y. M., Yamada Y., Yano T., (1986), *Chem. Eng. Commun.*, 45, 207-212.
15. van Eijs A. M. M., de Jong J. P. L., Doddema H. J., Lindeboom D. R., (1988), *Proc. Int. Symp. S. C. Fluids*, Ed. M. Perrut, 933-942, Société Française de Chimie, Paris.
16. Pasta P., Mazzola G., Carrea G., Riva S., (1989), *Biotechnol. Lett.*, 11, 643-648.
17. Randolph T. W., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1988), *AIChE J.*, 34, 1354-1360.
18. Chi Y. M., Nkamura K., Yamada Y., Yano T., (1988), *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1541-1551.
19. Erickson J. C., Schyns P., Cooney C. L., (1990), *AIChE J.*, 36, 299-301.
20. Rantakylä M., Aaltonen O., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 825-830.
21. Martins J. F., Carvalho I. B., Sampaio T. C., Barreiros S., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 785-790.
22. Fontes N., Almeida M. C., Peres C., Garcia S., Grave J., Aires-Baros M. R., Soares C. M., Cabral J. M. S., Maycock C. D., Barreiros S., (1998), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 37, 3189-3194.



23. Miller D. A., Blanch H. W., Prausnitz J. M., (1991), *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 1354-1360.
24. Nakamura K., Fujii H., Chi Y.M., Yano T., (1990), *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 613, 319-322.

## Enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub>

### Summary

Applications of supercritical fluid technology in enzymatic biocatalysis is reviewed. The influence of the pressure, moisture level and entrainers on the performance of enzymatic reactions in supercritical CO<sub>2</sub> are discussed.

### Key words:

supercritical CO<sub>2</sub>, enzymes, biocatalysis.

### *Adres do korespondencji:*

Janusz J. Malinowski, Instytut Inżynierii Chemicznej PAN, ul. Bałtycka 5,  
44-100 Gliwice, e-mail: j.mal@iich.gliwice.pl