



Optymalizacja syntezy estrów katalizowanej przez lipazę *Mucor javanicus* T45 w środowisku niewodnym

Tadeusz Antczak

Edward Galas

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

1. Wstęp

Biokataliza w środowiskach niekonwencjonalnych jest jednym z prężnie rozwijających się działów biotechnologii (1-4). Dział ten posiada zarówno znaczenie podstawowe jak i aplikacyjne.

Jedną z grup enzymów wykazujących aktywność w środowiskach niewodnych są hydrolazy estrów glicerolowych (EC 3.1.1.3), nazywane także lipazami. W środowisku rozpuszczalników organicznych enzymy te posiadają właściwość rewersji reakcji hydrolitycznych w kierunku syntezy (5-8). Użycie lipaz w takich reakcjach posiada wiele zalet, szczególnie w porównaniu z tradycyjnymi katalizatorami chemicznymi. Możemy do nich zaliczyć:

- dużą specyficzność działania;
- możliwość uniknięcia niepożądanych reakcji ubocznych, jak również hamowania przebiegu reakcji przez substrat

lub produkt;

- małą, w porównaniu z metodami tradycyjnymi, energochłonność procesu;
- stosunkową łatwość odzyskiwania produktu i biokatalizatora z systemów zawierających fazę organiczną;
- możliwość wielokrotnego stosowania enzymu w procesach periodycznych lub prowadzenia syntezy ciągłej.

Środowisko reakcji wywiera zdecydowany wpływ na wydajność procesu syntezy. Źródło i stężenie lipazy, budowa chemiczna rozpuszczalnika organicznego, jego stężenie, zawartość wody, proporcje molowe substratów, stężenie aktywatorów chemicznych, czas i temperatura procesu decydują o ostatecznym przebiegu reakcji syntezy (1,2,9,10). Ma to zwłaszcza duże znaczenie przy prowadzeniu reakcji estryfikacji dla wysokich wyjściowych stężeń substratów. Im ono jest wyższe tym potencjalnie większe będzie stężenie wydzielonej wody w środowisku reakcji. Ponieważ woda zmienia kierunek reakcji należy tak dobrać składniki środowiska aby zapewnić, przy możliwie wysokim stężeniu wyjściowym substratów, ich maksymalne przereagowanie.

Dodatek niektórych substancji chemicznych wykazujących właściwość tworzenia wiązań wodorowych może korzystnie modyfikować warstwę wody niezbędnej enzymu w środowisku niewodnym, zwiększając jego aktywności (2,11).

Stwierdzono, że dietanoloamina (DEtA) wykazuje, w zależności od stężenia, działanie aktywujące lub inhibujące lipazę *Mucor javanicus* w środowisku eteru naftowego (10). Optymalizacja wszystkich wspomnianych czynników środowiska reakcji jest możliwa, lecz praktycznie ze względów technicznych niewykonalna w laboratorium. Nie wszystkie z nich wywierają równie znaczący wpływ na proces syntezy. Niektóre można po wykonaniu badań wstępnych przyjąć z dużym prawdopodobieństwem jako stałe, co urealni wykonanie pełnego eksperymentu optymalizacyjnego w laboratorium.

2. Materiały i metody

2.1 Otrzymywanie lipazy

Preparat lipazy *Mucor javanicus* T45 w postaci odwodnionego mycelium otrzymywano zgodnie z patentem (12).

2.2. Optymalizacja procesu syntezy estrów za pomocą metody gradientowej

Enzymatyczną syntezę estrów w środowisku eteru naftowego optymalizowano za pomocą metody gradientowej (13,14). Badania prowadzono dla modelowej syntezy oleinianu butylu. Jako stałe parametry procesu przyjęto: tem-

peraturę — 37°C, czas reakcji — 20 godzin, objętość rozpuszczalnika — 5 cm³ i obroty wytrząsarki, na której umieszczono naczynia reakcyjne 275 min⁻¹.

Optymalizowanymi, zmiennymi parametrami były:

X₁ — masa kwasu oleinowego (g);

X₂ — masa 1-butanolu (g);

X₃ — masa lipazy *Mucor javanicus* T45 (mg);

X₄ — masa aktywatora (dietanoloamina) (mg).

Szukano za pomocą metody gradientowej maksimum funkcji czterech zmiennych:

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_4 + a_0$$

Dla dobrego przeprowadzenia eksperymentu konieczne było wyznaczenie skoku zmiennej, tak aby nie był zbyt duży (mogłoby to „przeskoczyć” maksimum), ani zbyt mały (gdyż może to doprowadzić do zwiększenia liczby wykonywanych eksperymentów).

W pierwszym doświadczeniu przyjęto skok równy 5%. Dla pozostałych badań dokonano wyboru skoku zmiennej po wykonaniu I serii prób i wyznaczeniu przybliżenia gradientu funkcji w pierwszym punkcie. Ustalono wykonanie eksperymentu pełnego czyli liczba prób wynosiła 2ⁿ = 16, n — liczba zmiennych równa 4. Wartości zmiennych X₁, X₂, X₃, X₄ dla każdej próbki z uwzględnieniem skoku zmiennej wyliczono na podstawie planu eksperymentu przedstawionego w tab. 1.

TABELA 1
PLAN EKSPERYMENTU OPTIMALIZUJĄCEGO

Nr próby	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-

Znaki wskazują kierunek zmian zmiennych wokół punktu środka pierwszego strzału. Trzeba te zmiany odpowiednio dodać lub odjąć od współrzędnych środka, ażeby otrzymać konkretną liczbę zmiennych w każdym z doświadczeń. Na podstawie danych zawartych w tab. 1 wykonano plan eksperymentu z uwzględnieniem 16 prób. Na jego podstawie wyznaczono masy reagentów do sporządzenia naważek zmiennych parametrów w poszczególnych doświadczeniach.

Reakcję syntezy estrów prowadzono w środowisku eteru naftowego. Po reakcji pobierano próbkę w ilości $0,8 \text{ cm}^3$ i miareczkowano $0,05 \text{ M}$ alkoholowym roztworem NaOH do $\text{pH} = 10$. Na podstawie zużytego ługu potrzebnego na odmiareczkowanie nie przereagowanego w reakcji kwasu tłuszczowego określono liczbę mmoli estru i procent estryfikacji (stopień przereagowania kwasu). W eksperymencie końcowym procent estryfikacji wyrażano także stopniem przereagowania alkoholu.

Po uzyskaniu wyników z eksperymentu wyznaczono wektor gradientu A, stosując do obliczeń metodę opartą na regule najmniejszych kwadratów. Do tego celu wykorzystano program komputerowy „Baza Danych Estru” powstały w Instytucie Biochemii Technicznej. Za pomocą tego programu wyznaczano również punkt następnego „strzału” i wartości zmiennych $X_1 - X_4$ dla każdego następnego eksperymentu.

3. Wyniki i dyskusja

W badaniach wstępnych, prowadząc estryfikację wyższych kwasów tłuszczowych pierwszorzędowymi alkoholami alifatycznymi, katalizowaną przez lipazę *Mucor javanicus* stwierdzono, że dla wyższych stężeń wyjściowych substratów (stężenie całkowite w mieszaninie reakcyjnej 50%) nie można uzyskać wyższego stopnia przereagowania niż 75%, co eliminowało praktyczne wykorzystanie tej lipazy.

Z tego powodu podjęto próbę optymalizacji warunków syntezy estrów z zastosowaniem DEtA jako modyfikatora warstwy wody niezbędnej lipazy *Mucor javanicus*.

W procesie optymalizacji przyjęto 3 kryteria oceny eksperymentu:

Y_1 — stopień przereagowania liczony względem kwasu (%);

Y_2 — liczba mmoli estru otrzymanego w reakcji syntezy;

Y_3 — iloczyn obu tych wielkości podzielony przez 100.

Kryterium Y_3 było miarą produktywności procesu, dlatego ten parametr stanowił główną podstawę oceny syntezy estru.

Dane z programu komputerowego „Baza Danych Estru”, opisujące pierwszy i siódmy eksperyment optymalizacyjny zamieszczono w tab. 2 i 3.

TABELA 2
PIERWSZY EKSPERYMENT OPTIMALIZACYJNY

Optymalizacja 1		SYNTEZA ESTRÓW			
reagenty		wartość	dx	naważka	Dx
1) kwas oleinowy		2,2458	0,0000	2,2458	0,1000
2) 1-butanol		0,5991	0,0000	0,5991	0,0500
3) lipaza <i>Mucor javanicus</i>		120,000	0,0000	120,500	8,0000
4) dietanoloamina		0,0633	0,0000	0,0633	0,0050
E(y)	E(y1) = 82,0997	E(y2) = 6,5266		E(y3) = 5,3635	
	A0= 95,8890	1,4620		2,1506	
	A1= -16,9577	1,5076		0,1738	
	A2= 64,6063	5,0014		8,2305	
	A3= -0,1175	-0,0094		-0,0154	
	A4= -3,9688	-2,9787		-3,9889	
Następny „strzał”					
1)	0,5500 g	2,3966 g		2,2632 g	
2)	3,8294 g	0,8492 g		1,0106 g	
3)	119,5597 mg	120,4250 mg		120,3768 mg	
4)	0,0435 mg	0,0484 mg		0,0434 mg	

E(y) — współczynniki równania dla poszczególnych kryteriów oceny.

TABELA 3
SIÓDMY EKSPERYMENT OPTIMALIZACYJNY

Optymalizacja 1		SYNTEZA ESTRÓW			
reagenty		wartość	dx	naważka	Dx
1) kwas oleinowy		3,0241	0,0250	3,0237	0,0250
2) 1-butanol		1,0312	0,0150	1,0302	0,0150
3) lipaza <i>Mucor javanicus</i>		120,000	8,0000	120,000	8,0000
4) dietanoloamina		0,0136	0,0015	0,0137	0,0001
E(y)	E(y1) = 90,7334	E(y2) = 9,7025		E(y3) = 8,8062	
	A0= 94,3560	0,2988		0,4856	
	A1= -0,7031	3,1444		2,8233	
	A2= -15,2039	-1,5738		-2,8762	
	A3= 0,0562	0,0061		0,0111	
	A4= 539,5732	57,2375		103,3170	
Następny „strzał”					
1)	3,0065 g	3,1027 g		3,0947 g	
2)	0,8031 g	1,0076 g		0,9881 g	
3)	120,4498 mg	120,0487 mg		120,0884 mg	
4)	0,0672 mg	0,0193 mg		0,0239 mg	

E(y) — współczynniki równania dla poszczególnych kryteriów oceny.

W trakcie przeprowadzania procesu optymalizacji zaobserwowano zmniejszenie się wartości gradientów optymalizowanych składników dla kolejnych pełnych eksperymentów. Świadczyło to o zbliżaniu się do punktu optymalnego.

Po wykonaniu siódmego pełnego doświadczenia wartości gradientów były niewielkie, stąd podjęto decyzję o przeprowadzeniu eksperymentu końcowego w tym punkcie.

TABELA 4
KOŃCOWE WYNIKI EKSPERYMENTÓW SKŁADOWYCH

Nr eksperymentu	Wartości zmiennych w punkcie centralnym				Wyniki według kryterium		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁ (%)	Y ₂ (mmol)	Y ₃ =Y ₁ ×Y ₂
1	2,246	0,599	120,0	0,0633	82,10	6,27	5,364
2	2,262	1,009	120,0	0,0432	89,86	7,194	6,475
3	2,441	0,920	120,0	0,0306	92,07	7,948	7,320
4	2,599	0,843	120,0	0,0206	94,45	8,682	8,200
5	2,833	0,882	120,0	0,0259	92,94	9,313	8,660
6	3,024	1,030	120,0	0,0137	90,73	9,703	8,806
7	3,095	0,998	120,0	0,0239	93,27	10,210	9,523

X₁ — naważka kwasu oleinowego (g); X₂ — naważka 1-butanolu (g); X₃ — naważka lipazy *Mucor javanicus* T45 (mg); X₄ — naważka DEtA (dietanolaminy) (g).

Skok zmiennych w punkcie centralnym:

ΔX_1 — 0,05 dla eksperymentów 1-3 i 0,025 dla doświadczeń 4-7; ΔX_2 — 0,05 dla eksperymentów 1-2, 0,025 dla doświadczeń 3, 0,0125 dla eksperymentów 4 i 0,05 dla badań 5-7; ΔX_3 — 8,0 dla eksperymentów 1-7; ΔX_4 — 0,0025 dla doświadczeń 1-2, 0,005 dla prób 3, 0,0005 dla eksperymentów 4, 0,0015 dla badań 5-7.

Na podstawie otrzymanych wyników (tab. 4) stwierdzono znaczny wzrost stopnia przereagowania liczonego względem kwasu: z 82,1% na początku procesu do 93,27%. W ocenie całego procesu optymalizacji dużą uwagę skierowano na zmianę kryterium produktywności (Y₃). Zaobserwowano dość znaczny wzrost tej wartości z 5,364 do 9,523. Na tej podstawie stwierdzono, że proces optymalizacji został przeprowadzony w odpowiednim kierunku, umożliwiając określenie warunków reakcji syntezy estrów w pobliżu punktu optymalnego.

W trakcie przeprowadzania eksperymentów okazało się, że na wydajność reakcji estryfikacji miały wpływ zmienne X₁, X₂ i X₄ czyli masa kwasu, alkoholu i aktywatora, natomiast wartość X₃ (masa mg lipazy) w każdym eksperymencie jest bardzo zbliżona i wynosiła ok. 120 mg w próbie. Tak nikły wpływ naważki enzymu na wydajność estryfikacji sugeruje skrócenie czasu reakcji lub zmniejszenie naważki lipazy. Trzeba jednak zasygnalizować ogromną rolę aktywatora (dietanolaminy), który dodany w niewielkiej ilości znacznie zwiększał efektywność procesu. Wydajność reakcji enzymatycznej estryfikacji

bez dodatku aktywatora nie przekroczyła 75%. Dodatek dietanolaminy umożliwił prowadzenie procesu z wydajnością ponad 90%.

Z praktycznego punktu widzenia bardzo ważna jest nie tylko wydajność estryfikacji, lecz także stężenie wyjściowe substratów. Porównując pierwszy i siódmy eksperyment, sumaryczne wyjściowe stężenie kwasu i alkoholu wzrosło o ok. 70%, a wydajność estru, dla tej samej ilości lipazy, wzrosła o 64%. Prowadzenie procesu estryfikacji przy stężeniu wyjściowym substratów ponad 50% z wydajnością 90-95%, rokuje praktyczne wykorzystanie tej metody syntezy estrów.

Po wykonaniu siódmego eksperymentu określono na podstawie danych wyjściowych (tab. 4) ostateczne parametry syntezy oleinianu butylu. Parametry te były punktem wyjścia do syntezy estrów kwasu oleinowego i alkoholi, innych niż 1-butanol. W niektórych przypadkach stosowano inne proporcje molowe kwasu do alkoholu. Rezultaty określające stopień przereagowania substratów liczony względem kwasu oleinowego i alkoholu podano w tab. 5.

TABELA 5
PREPARATYWNE SYNTEZY ESTRÓW KWASU OLEINOWEGO

Typ alkoholu	Kwas		Alkohol		Eter naftowy		Ester (mmol)	Przereagowanie (%)	
	(g)	(mmol)	(g)	(mmol)	(g)	(mmol)		kwas	alkohol
I	31,633	111,88	4,345	135,60	32,906	416,53	66,39	59,34	48,96
II	38,046	134,56	6,191	134,38	26,676	337,67	123,17	91,54	91,66
III	31,880	112,75	9,917	133,80	31,082	393,44	105,40	93,48	78,78
IV	31,846	112,63	12,610	170,13	32,517	411,61	103,72	92,09	60,96
V	32,826	116,10	13,605	133,16	32,677	413,63	105,17	90,58	78,98
VI	31,756	112,31	48,372	416,25	33,140	418,23	105,55	93,97	25,36
VII	31,668	112,00	23,071	134,03	32,965	417,28	105,45	94,15	78,67
VIII	31,787	112,42	14,419	133,51	32,500	411,39	95,12	84,61	71,25
IX	32,109	113,56	18,547	134,23	33,147	419,58	93,66	82,48	69,78
X	31,644	111,85	33,420	123,46	33,238	420,73	106,12	94,99	85,96
XI	31,705	112,35	28,456	105,95	42,981	544,06	105,42	94,01	99,48

Stosowane alkohole: I — metanol, II — etanol, III — 1-butanol, IV — 2-butanol, V — 1-heksanol, VI — 1-heptanol, VII — 1-undekanol, VIII — benzyłowy, IX — 4-metoksybenzyłowy, X — stearyłowy, XI — oleinowy.

Warunki reakcji: alkohol, kwas i eter naftowy, 1,2 g lipazy *Mucor javanicus*, 0,239 g dietanolaminy, czas 20 godz., temp. 37°C, mieszanie 275 min⁻¹.

W przypadku alkoholi bardziej lotnych od kwasu oleinowego stopień przereagowania liczony względem alkoholu ma mniejsze znaczenie. Jego nie przereagowany nadmiar można po skończonej reakcji oddestylować z rozpuszczalnikiem i zawrócić do następnej syntezy. W przypadku syntez wosków jest równie ważny stopień przereagowania kwasu, jak i alkoholu, które powinny być zbliżone do 100%.

W przeprowadzonych próbach preparatywnych syntezy estrów kwasu oleinowego po optymalizacji wykazano, że lipaza *Mucor javanicus* T45 aktywowana DEtA w środowisku eteru naftowego katalizowała syntezę estrów alkoholi alifatycznych C₂-C₁₈ z wydajnością 90-95%. Dowodzi to, że badana lipaza wykazuje zbliżone powinowactwo do alkoholi alifatycznych o tej długości łańcucha węglowego.

Estry alkoholu benzyłowego i 4-metoksybenzyłowego powstawały z wydajnością ok. 84%, oleinian metylu z wydajnością ok. 60%. W tych przypadkach należałoby przeprowadzić odrębne eksperymenty optymalizacyjne.

Metodę otrzymywania estrów wyższych kwasów tłuszczowych z zastosowaniem lipazy *Mucor* opatentowano (14,15,16).

4. Podsumowanie

Przeprowadzenie optymalizacji syntezy estrów za pomocą metody gradientowej pozwoliło na określenie optymalnych warunków tej reakcji. Dla stężenia wyjściowego substratów w środowisku reakcji 57-66% uzyskano stopień konwersji kwasu tłuszczowego w granicach 90-95%. Przeniesienie zoptymalizowanych warunków syntezy oleinianu butylu na oleiniany innych alkoholi alifatycznych umożliwiło opracowanie prostych w wykonaniu metod syntezy całej gamy estrów kwasu oleinowego i alkoholi alifatycznych C₂-C₁₈.

Literatura

1. *Progress in Biotechnology*, vol. 8, Biocatalysis in Non-Conventional Media, (1992), Eds. Tramper J., Vermue M. H., Beefting H. H., van Stockar U., Elsevier, Amsterdam.
2. Zaks A., Russell A. J., (1988), *J. Biotechn.*, 8, 259-270.
3. Khmielnicki Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K., (1988), *Biotechnologia*, 4, 292-308.
4. Butler L. G., (1979), *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 253-259.
5. Borzeix F., Monot F., Vandecastelle J., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 791-797.
6. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 38, 95-110.
7. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 1 (11), 62-70.
8. Lazar G., Henkel K., (1985), *Fette Seifen Anstrichmittel*, 10, 394-400.
9. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
10. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 1(20), 59-67.
11. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.
12. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1990), Patent nr 150601.
13. Achnazarowa S. L., Kafarow W. W., (1982), *Optymalizacja eksperymentu w chemii i technologii chemicznej*, WNT, Warszawa.
14. Galas E., Bielecki S., Antczak T., Wieczorek A., Błaszczuk R., (1981), *Advances in Biotechnology*, vol. 3, Fermentation Products, 301-306.
15. Antczak T., Galas E., (1991), Zgłoszenie patentowe P-291717.
16. Antczak T., Galas E., (1991), Zgłoszenie patentowe P-291719.
17. Antczak T., Galas E., (1991), Zgłoszenie patentowe P-291718.

An optimization of esters synthesis catalysed by *Mucor javanicus* T45 lipase in non-water media

Summary

An optimization of enzymatic synthesis of esters in nonwater environment was performed by means of a gradient method. The studies were aimed at obtaining a model synthesis of buthyl oleate catalyzed by *Mucor javanicus* T45 lipase.

The optimized, changed parameters were as follows: substrates mass, lipase mass and chemical activator mass (diethanolamine) which profitably modified the essential water layer of the lipase. For the initial concentration of the substrates equal to 57-67%, in the reaction environment the obtained yield of conversion of oleic acid was in the range of 90-95%.

A transfer of optimized conditions of buthyl oleate synthesis onto oleates of the other aliphatic alcohols, enabled elaboration of simple in performance methods of synthesis of a broad variety of esters of oleic acid and aliphatic alcohols (C₂-C₁₈).

Key words:

fungal lipase, synthesis of esters, optimization, gradient method, organic solvents, chemical modification, essential water layer.

Adres dla korespondencji:

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