



# Środowisko reakcji w syntezie estrów katalizowanej przez lipazę *Mucor javanicus* T45

Tadeusz Antczak

Dariusz Hiler

Edward Galas

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

## 1. Wstęp

Środowisko reakcji determinuje wiele właściwości enzymów (1-5). W procesie syntezy estrów, czynniki środowiska wpływające na przebieg reakcji można podzielić na:

– biologiczne: źródło lipazy (drobnoustrój, roślina lub zwierzę);

– chemiczne: specyficzność lipazy, skład i właściwości fazy organicznej, stężenie wody, rodzaj substratów i ich stężenia molowe, rodzaj i stężenie ewentualnych aktywatorów reakcji, pH wody zawartej w preparacie enzymatycznym;

– fizyczne: czas trwania reakcji, temperatura mieszaniny reakcyjnej, sposób i parametry mieszania, ciśnienie.

Czynniki biologiczne i fizyczne są stałe podczas trwania reakcji, podobnie jak większość parametrów chemicznych. Wpływ poszczególnych czynników stałych można określić badając ich indywidualne znaczenia w procesie syntezy lub prowadząc optymalizację uwzględniającą jednoczesne zmiany kilku czynników.

Zmieniają się natomiast niektóre czynniki chemiczne, np. stężenia substratów i produktów reakcji; ma to szczególne znaczenie w przypadku dużych stężeń substratów, właściwych dla zastosowań praktycznych, a nie badań modelowych. Największy wpływ na wydajność reakcji wywiera stężenie wody w jej środowisku. Woda jest czynnikiem stabilizującym konformację katalityczną enzymu i jednocześnie, tym składnikiem środowiska, który cofa reakcję syntezy (6). Ostateczny efekt estryfikacji jest zatem wynikiem wzajemnych oddziaływań wszystkich wymienionych parametrów.

W syntezie organicznej istnieje kilka sposobów zwiększania wydajności reakcji. Niektóre z nich mają także zastosowanie w przypadku syntezy katalizowanej przez lipazy. Można do nich zaliczyć usuwanie jednego z produktów reakcji w trakcie syntezy, stosowanie nadmiaru jednego substratów lub dodatków substancji chemicznych zwiększających wydajność estryfikacji.

Blain i in. (7) w celu usunięcia powstałej podczas estryfikacji wody zastosowali sito molekularne 4 Å dodawane bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej, uzyskując wzrost wydajności reakcji. Knox i in. (8) prowadzili ciągłą syntezę estru w kolumnie wypełnionej preparatem immobilizowanej lipazy. Wytworzoną podczas syntezy wodę usuwali przepuszczając mieszaninę reakcyjną przez dodatkową kolumnę wypełnioną sitem molekularnym. Miller i in. (9) prowadzili syntezę wosków bez udziału rozpuszczalnika organicznego. Powstałą wodę oddestylowywali ze środowiska prowadząc reakcję pod obniżonym ciśnieniem.

Odrębnym problemem w enzymatycznej syntezie estrów są wzajemne molowe proporcje substratów w mieszaninie reakcyjnej. Ogólna zasada, będąca konsekwencją określonej wartości stałej równowagi chemicznej w reakcjach katalizowanych przez lipazy może mieć zastosowanie w ograniczonym zakresie. Powodem tego stanu jest zjawisko inhibicji, któremu ulegają lipazy pod wpływem reagentów.

Obecnie znane są już podstawowe kryteria doboru rozpuszczalnika organicznego w reakcji syntezy estrów (4,10). Rozpuszczalnik powinien mieszać się w sposób ograniczony z wodą oraz zakłócać warstwę wody niezbędnej enzymu w stopniu możliwie najmniejszym. Jeżeli siła wiązania warstwy wody niezbędnej z lipazą jest duża, to enzym może wykazywać właściwość syntezy estrów nawet w rozpuszczalnikach dobrze mieszających się z wodą (10). Zastąpienie części molekuł wody w warstwie wody niezbędnej molekułami innych substancji chemicznych, wykazujących właściwość tworzenia wiązań wodorowych lub zmiana pH warstwy wody niezbędnej może prowadzić do zwiększenia aktywności enzymu (2). Zjawisko takie zaobserwowano też dla lipaz (11).

Siła wiązania, rejony występowania i grubość warstwy wody niezbędnej jest cechą indywidualną lipazy, uzależnioną od jej struktury pierwszorzędowej i konformacji. Ponieważ poznano strukturę przestrzenną oraz budowę centrum katalitycznego tylko niewielu lipaz (12,13), jest oczywiste, że w rutynowych badaniach laboratoryjnych możemy prowadzić poszukiwania optymalnego środowiska reakcji jedynie metodą prób i błędów.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Otrzymywanie lipazy

Lipazę *Mucor javanicus* T45 w postaci odwodnionego mycelium otrzymano według patentu (14). W badaniach wpływu pH na syntezę estrów, mycelium zawieszano w buforze fosforanowym 0,05 M o pH z przedziału 6-8 i liofilizowano w aparacie Modulyo (Edwards).

### 2.2 Synteza estrów

Syntezę estrów prowadzono w szczelnie zakrytych naczyniach o pojemności 30 cm<sup>3</sup>, przy obrotach wstrząsarki 220 rpm. Skład mieszanin reakcyjnych oraz parametry syntezy zamieszczono pod tabelami. Wydajność estryfikacji oznaczano metodą alkalimetryczną, odmiareczkując nieprzereagowany kwas (7) i wyrażano w % estryfikacji lub w mmolach powstałego estru. Powstałe estry zidentyfikowano chromatograficznie (4) oraz za pomocą analizy IR.

### 2.3. Badania termostabilności lipazy *M. javanicus*

Do naczynia z zamknięciem hermetycznym dodawano 50 mg lipazy oraz 5 cm<sup>3</sup> rozpuszczalnika organicznego lub wody i inkubowano w temp. 100°C w czasie: 60 min dla rozpuszczalników organicznych i 1 min dla wody.

Natępnie próby schładzano, sączono, przemywano eterem naftowym i oznaczano ich aktywność w syntezie oleinianu butylu.

## 3. Wyniki i dyskusja

Wiadomo, że enzymy wykazują aktywność katalityczną w środowisku organicznym w temp. 100°C i wyższych (2,15). Aby wytypować grupę rozpuszczalników o niewielkim wpływie denaturującym na enzym przeprowadzono badania stabilności lipazy *Mucor javanicus* w temp. 100°C (tab. 1). Badany enzym ogrzewany przez 1 godzinę w temp. 100°C w środowisku węglowodorów: eteru naftowego, cykloheksanu, heptanu lub benzenu zachowywał ok. 90% aktywności syntetycznej. Wysoką aktywność przejawia też lipaza po ogrzewaniu w środowisku heksanu, heksadekanu i toluenu. Dla wymienionych rozpuszczalników współczynnik polarności – hydrofobowości log P (10) jest zawarty w zakresie 2,0-8,8. Rozpuszczalniki te powinny być „preferowane” jako środowisko syntezy estrów katalizowanej przez lipazę *M. javanicus*. Rozpuszczalniki hydrofilowe wykazują silniejsze działanie denaturujące na enzym niż substancje hydrofobowe. Woda w temperaturze 100°C natychmiast denaturuje lipazę. Przyjmując, że centrum aktywne lipazy *M. javanicus* – podobnie jak w przypadku lipazy *M. miehei* (12) ma charakter hydrofobowy – substancje o charakterze hydrofobowym mogą wykazywać działanie ochronne względem

tego rejonu. W przypadku niektórych alkoholi, kwasów, estrów i eterów mogą występować także dodatkowe oddziaływania, typu enzym-inhibitor stabilizujące konformację lipazy.

TABELA 1  
STABILNOŚĆ LIPAZY *MUCOR JAVANICUS* W RÓŻNYCH ROZPUSSZCZALNIKACH W TEMP. 100°C

Rodzaj rozpuszczalnika	Estryfikacja (%)	Rodzaj rozpuszczalnika	Estryfikacja (%)
woda <sup>a</sup>	0	Alkohole	
eter		etanol	0
butylowoetylowy	0	tert-Butyl alcohol	8,48
eter di-pentylowy	48,33	tert-Amyl alcohol	0
eter naftowy	88,96	1-butanol	44,02
heksan	79,77	1-heksanol	69,13
cykloheksan	92,52	1-heptanol	37,34
heptan	88,78	1-undekanol	73,04
izooktan	81,93	glicerol	0
dodekan	32,27	4-metoksybenzylowy	17,82
heksadekan	66,11	stearylowy	90,96
benzen	86,60	oleilowy	30,13
toluen	73,88	d,l-mentol	82,40
Estry		Kwasy	
maślan metylu	81,70	kaprylowy	6,62
trioctan <sup>b</sup>	36,25	2-metylokapronowy	0
trimaślan <sup>b</sup>	70,15	oleinowy	42,28
tristearynian <sup>b</sup>	90,24	mirystynowy	4,20
tripalmitynian <sup>b</sup>	88,17	laurynowy	52,63
trioleinian <sup>b</sup>	63,97	linolowy	48,28
oleinian butylu	93,26	erukowy	0
		Próba odniesienia <sup>c</sup>	100

a – czas inkubacji 1 min, we wszystkich pozostałych rozpuszczalnikach czas inkubacji 60 min,

b – estry glicerolu,

c – aktywność lipazy *M. javanicus* przed działaniem temp.

Skład mieszaniny reakcyjnej podczas wyznaczania aktywności lipazy: 1 mmol kwasu oleino-  
wego, 1 mmol 1-butanolu, 50 mg lipazy, 5 cm<sup>3</sup> eteru naftowego, czas reakcji 20 godz, temp.  
30°C.

W wybranych rozpuszczalnikach przeprowadzono syntezę estrów (tab. 2). Stwierdzono, że rozpuszczalniki organiczne scharakteryzowane w poprzednim doświadczeniu jako „preferowane” dla reakcji syntezy ( $\log P$  2,0-8,8) wykazują dobre właściwości jako środowisko reakcji estryfikacji. Zależność  $E = f(\log P)$  (gdzie  $E$  = Estryfikacja (%)) w badanych przypadkach wykazuje maksimum co, jak się wydaje, jest cechą charakterystyczną lipazy *M. javanicus* (11). W środowisku rozpuszczalników (z „preferowanego” zakresu  $\log P$ ) podstawionych chlorem lipaza *M. javanicus* nie syntetyzowała estrów (tab. 2).

TABELA 2

WPLYW RODZAJU ROZPUSZCZALNIKA ORGANICZNEGO NA WYDAJNOŚĆ SYNTAZY ESTRÓW KATALIZOWANYCH PRZEZ LIPAZĘ *M. JAVANICUS* T45

Rozpuszczalniki <sup>1</sup>	$\log P$	Estryfikacja E (%)	
		a	b
dimetylosulfotlenek	- 1,3	0	0
dioksan	- 1,1	0	0
N,N-dimethylformamid	- 1,0	0	0
aceton	- 0,23	12,3	13,5
dichlorometan	1,3	0	0
eter butylowoetylowy	1,9	50,2	37,7
benzen	2,0	73,1	57,6
chloroform	2,0	0	0
toluen	2,5	81,0	66,5
cykloheksan	3,2	82,0	79,5
eter naftowy	3,2 <sup>2</sup>	83,2	82,5
heksan	3,5	84,7	81,3
heptan	4,0	86,1	80,2
izooktan	4,5	86,4	78,3
dodekan	6,6	67,5	45,1
heksadekan	8,8	47,1	27,5

a - substraty: kwas stearynowy i 1-propanol,

b - substraty: kwas oleinowy i 1-butanol,

1 - rozpuszczalniki osuszone sitem molekularnym 4Å,

2 - wyliczony ze składu mieszaniny reakcyjnej.

Skład mieszaniny reakcyjnej jak w tab. 1.

Przeprowadzono próby syntezy oleinianu butylu w środowisku substratów bez udziału rozpuszczalnika organicznego. W temp. 100°C reakcja syntezy estru nie zachodziła. W tej temperaturze w każdym z osobna składników środowiska (alkoholu lub kwasie) lipaza nie ulegała inaktywacji (tab. 1). Je-

dynym składnikiem środowiska, który mógł zinaaktywować enzym jest wydzielająca się w estryfikacji woda. Jej ilość jest tak mała, że analizowana zmiana stężenia kwasu oleinowego mieści się w granicach błędu oznaczenia.

Prowadząc badania nad syntezą laktonu kwasu 16-hydroksyheksadekanowego stwierdzono za pomocą chromatografii gazowej, że lipaza *M. javanicus* L46 w temperaturze 100°C w środowisku eteru naftowego katalizuje syntezę tego laktonu (11). Podczas tego procesu ilość wydzielonej wody była bardzo mała (rzędu  $2,4 \times 10^{-6}$  mmola), a obecność eteru naftowego dodatkowo stabilizowała lipazę.

TABELA 3  
WPLYW STĘŻENIA SUBSTRATÓW NA STOPIEŃ SYNTAZY OLEINIANU BUTYLU W RÓŻNYCH TEMP.

Temp. (°C)	$\frac{[\text{mmol Al}]}{[\text{mmol Kw}]}$	(%) <sup>a</sup>	$\frac{[\text{mmol Kw}]}{[\text{mmol Al}]}$	(%) <sup>b</sup>
40	0,331	28,07	3,021	84,92
	1,067	62,51	0,937	58,59
	2,502	48,04	0,400	19,20
50	0,177	15,57	5,664	88,18
	0,334	26,43	2,944	77,80
	0,816	55,01	1,225	67,39
60	1,517	35,79	0,659	23,60
	0,759	32,39	1,318	42,70
	1,403	39,11	0,713	27,88
70	2,311	31,12	0,433	13,46
	0,172	13,54	5,829	78,93
	0,524	19,10	1,908	36,46
80	0,901	21,35	1,109	23,69
	1,455	15,88	0,687	10,91
	0,201	4,92	4,975	24,48
	0,678	5,05	1,475	7,45
	1,234	5,08	0,810	4,12

**Warunki reakcji:**

8 mmoli kwasu oleinowego (Kw) i 1-butanol (Al) w stężeniu odpowiadającej współczynnikiem, czas reakcji 20 godz, szybkość mieszania 275 rpm,

a – stopień estryfikacji kwasu,

b – stopień estryfikacji alkoholu.

W temp. 80°C (tab. 3) lipaza katalizuje syntezę oleinianu butylu z wydajnością ok. 5%. Można przypuszczać, że lipaza katalizuje syntezę estru do momentu w którym wydzielona woda (w badanym przypadku ok. 0,4 mmola)

denaturuje enzym w tej temperaturze. Wydaje się, że problem denaturującego działania wody w środowisku rozpuszczalników organicznych w podwyższonych temperaturach ma głównie wymiar ilościowy.

Stwierdzono, że wzajemne proporcje molowe substratów wywierają wpływ na wydajność estryfikacji. Jego charakter jest uzależniony od środowiska reakcji. W środowisku substratów bez rozpuszczalnika organicznego stwierdzono wyraźny wpływ inhibujący nadmiaru alkoholu na aktywność lipazy *Mucor javanicus* (tab. 3). Wpływu takiego nie zaobserwowano dla nadmiaru kwasu.

Jeżeli do mieszaniny reakcyjnej wprowadzimy jeszcze jeden element środowiska – rozpuszczalnik organiczny to oddziaływanie środowiska reakcji na lipazę ulega zmianie. W obecności eteru naftowego alkohol w badanym zakresie stężeń nie wykazuje działania inhibicyjnego (tab. 4). Ze wzrostem stężenia rozpuszczalnika w środowisku reakcji wzrasta ilość powstałego estru. Niewielki wpływ inhibujący na lipazę wywiera kwas oleinowy.

TABELA 4

WPŁYW STĘŻENIA ROZPUSZCZALNIKA NA WYDAJNOŚĆ SYNTAZY OLEINIANU BUTYLU

Rozpuszczalnik (mmol)	$\frac{[ \text{mmol Al} ]}{[ \text{mmol Kw} ]}$	(%) <sup>a</sup>	$\frac{[ \text{mmol Kw} ]}{[ \text{mmol Al} ]}$	(%) <sup>b</sup>
14,91	0,218	15,01	4,587	68,74
15,62	0,817	62,59	1,224	76,54
14,92	2,806	68,71	0,356	24,89
29,63	0,249	15,85	4,016	63,53
31,70	0,951	64,52	1,052	67,86
30,24	2,668	70,64	0,375	26,84
46,44	0,282	21,95	3,546	77,81
48,21	0,904	70,85	1,106	78,34
47,39	2,773	70,34	0,361	25,37

**Warunki reakcji:**

4,5 mmoli kwasu oleinowego (Kw) i 1-butanol (Al) w stężeniu odpowiadającej współczynnikiem, czas reakcji 20 godz, szybkość mieszania 275 rpm,

a – stopień estryfikacji kwasu,

b – stopień estryfikacji alkoholu.

Kolejnym czynnikiem środowiska wywierającym wpływ na wydajność enzymatycznej estryfikacji jest pH wody zawartej w preparacie enzymatycznym (2).

Dotychczas nie jest znana lokalizacja oraz liczba cząsteczek wody tworząca warstwę wody niezbędnej dla lipazy *Mucor javanicus*. Można się spodziewać, że fizyczna objętość warstwy przypadająca na molekułę lipazy jest niewielka. Nie wiadomo, czy wszystkie jony zawarte w buforze wnikają proporcjonalnie w warstwę wody niezbędnej. Dlatego obecnie trudno definiować zmiany bę-

dące następstwem zastosowanej preparatyki (liofilizacja preparatu lipazy w buforze o różnym pH) jako zmiany pH warstwy wody niezbędnej odpowiadające pH buforu. Ponadto bardzo ważny jest skład chemiczny buforu.

Stwierdzono, że aktywność lipazy *M. javanicus* w środowisku eteru naftowego w niewielkim stopniu jest uzależniona od pH z przedziału 6-8 buforu fosforanowego użytego do liofilizacji lipazy. Korzystne jest stosowanie buforów o  $\text{pH} < 6$ .

Lipaza *M. javanicus* w reakcji hydrolizy acylogliceroli – w środowisku wodnym w obecności buforu fosforanowego – wykazuje wyraźniejsze zmiany różnic aktywności w zależności od pH. Optimum w tym przypadku wynosi  $\text{pH} = 7,0$ .

Dodatek niektórych substancji chemicznych wykazujących zdolność do modyfikacji warstwy wody niezbędnej enzymu może prowadzić do wzrostu aktywności enzymu (2). W pracy (11) wykazano, że dodatek NN-dimetyloformamidu lub pirydyny do środowiska reakcji zwiększał ok. 10-krotnie aktywność lipazy *M. javanicus* L46 w syntezie laktonu kwasu 16-hydroksyheksadecanowego. Rusel i Zaks (2) twierdzą, że korzystna zmiana aktywności enzymu w takim przypadku jest wynikiem modyfikacji warstwy wody niezbędnej enzymu za pomocą użytej substancji chemicznej.

Stwierdzono, że dodatek dietanoloaminy (DEtA) zwiększa aktywność lipazy *M. javanicus*. Dietanoloamina w zależności od stężenia jest aktywatorem lub inhibitorem badanej lipazy. Efekt katalityczny samej DEtA w procesie syntezy oleinianu butylu w środowisku eteru naftowego jest znikomy. Dodatek ok. 0,14 mmola DEtA do środowiska reakcji zwiększa ilość powstałego estru o 74% (tab. 5).

TABELA 5  
ZALEŻNOŚĆ AKTYWNOŚCI LIPAZY *M. JAVANICUS* OD STĘŻENIA DIETANOLOAMINY (DEtA)

Lipaza (mg)	Kwas (mmol)	Alkohol (mmol)	DEtA <sup>a</sup> (mmol)	Ester (mmol)	Ester (%)
50	0,9475	1,1198	0,1187	0,5185	54,72
50	1,0483	1,0496	0,1385	0,6618	61,13
50	1,1293	1,0240	0,1802	0,6518	57,72
50	1,0826	1,0699	0,4802	0,1857	17,15
50	0,9436	1,1023	—	0,3796	40,23
—	1,0623	1,0538	0,1165	0	0

a – dietanoloamina (DEtA)

**Warunki reakcji:**

1 mmol kwasu oleinowego, 1 mmol 1-butanolu, czas reakcji 3 godz, temp. 37°C, szybkość mieszania 275 rpm.



#### 4. Podsumowanie

Dobór środowiska reakcji w enzymatycznej syntezie estrów jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na wydajność reakcji. Wszelkie zmiany środowiska reakcji muszą uwzględniać zmiany aktywności lipazy poprzez oddziaływanie bezpośrednie lub pośrednie na jej warstwę wody niezbędnej. Modyfikacja warstwy wody niezbędnej, jak się wydaje, jest kluczem do bardziej efektywnego stosowania enzymów jako katalizatorów wielu reakcji w środowisku rozpuszczalników organicznych.

#### Literatura

1. Butler L. G., (1979), *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 253-259.
2. Zaks A., Russell A. J., (1988), *J. Biotechnol.*, 8, 259-270.
3. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 38, 95-110.
4. Khmielnicki Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K., (1988), *Biotechnologia*, 4, 292-308.
5. Zaks A., Klivanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201.
6. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513-516.
7. Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E., Akhtar M. W., (1976), *Lipids*, 11, 553-560.
8. Knox T., Cliffe, (1984), *Process Biochemistry*, October, 188-192.
9. Miller C., Austin H., Posorske L., Gonzalez J., (1988), *JAACS*, 65, 927-931.
10. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
11. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.
12. Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J. P., Christiansen L., Huge-Jansen B., Norskov L., Thim L., Menge U., (1990), *Nature*, 343, 767-770.
13. Winkler F. K., D'Arcy A., Hunziker W., (1990), *Nature*, 343, 771-774.
14. Galas E., Antczak T., Krystynowicz A., (1989), Patent 150601.
15. Zaks A., Klivanov A. M., (1984), *Science*, 224, 1249-1251.

#### The influence of reaction conditions on synthesis of esters by *Mucor javanicus* T45 lipase

##### Summary

The effect of reaction milieu on synthesis of esters of higher fatty acids by *Mucor javanicus* T45 lipase was investigated.

The following factors were studied: a temperature, an organic solvent, concentrations of substrates and their molar ratios, a solvent concentration, pH of water present in the lipase preparation and a concentration of diethanolamine (DETA) applied to modify the essential water layer of the enzyme.

It was revealed that *M. javanicus* lipase, immobilized *in situ* in its mycelium, preserves from 48 to 92 per cent of the initial activity after heating for 1 hour at 100°C in nonpolar solvents. The modification of the enzyme essential water layer with DETA increases the synthetic activity of the enzyme by about 70%.

##### Adres dla korespondencji:

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