

### 1. Wstęp

Woda, podstawowy składnik organizmów, jest naturalnym środowiskiem działania enzymów, jednakże rozpuszczalniki organiczne, powszechnie znane jako substancje denaturujące białka, mogą stanowić środowisko reakcji dla wielu przemian enzymatycznych *in vitro*. Dotyczy to zwłaszcza tych reakcji, których substraty są nierozpuszczalne w wodzie, lub dla których możliwość przesunięcia równowagi reakcji metodami chemii organicznej (dodanie nadmiaru jednego z substratów, usuwanie produktu, np. estru lub wody za pomocą destylacji mieszaniny azeotropowej lub użycie środka odwadniającego) jest istotnie ograniczona.

Jedną z reakcji katalizowanych przez enzymy w środowisku rozpuszczalników organicznych jest synteza estrów kwasów karboksylowych z udziałem lipaz i esteraz. Lipazy (EC 3.1.1.3) są hydrolazami nierozpuszczalnych w wodzie estrów glicerolowych (1), natomiast enzymy hydrolizujące estry glicerolu i innych alkoholi rozpuszczalne w wodzie, zaliczono do esteraz (2). Lipazy, które *in vivo* hydrolizują jedynie acyloglicerole, w środowisku rozpuszczalników organicznych wykazują aktywność nie tylko w reakcji syntezy glicerydów, lecz i innych estrów różnorodnych alkoholi i kwasów karboksylowych. Cechą charakterystyczną lipaz, różniącą je od innych enzymów, jest wspomniana właściwość działania na substraty nierozpuszczalne w wodzie, co decyduje o przebiegu reakcji na powierzchni rozdziału faz z szybkością zależną od wielkości tej powierzchni (3,4). W środowisku wodnym, (stężenie molowe wody 55,5M), jest preferowana reakcja hydrolizy. Ponieważ różnice w zmianach energii swobodnej związane z kierunkiem reakcji hydroliza-synteza nie są duże, zwłaszcza dla reakcji katalizowanych przez peptydazy i esterazy (5), dlatego zmieniając środowisko reakcji można tak przesunąć równowagę, aby reakcja przebiegała w kierunku syntezy. Stwierdzono, że tego rodzaju zmianę kierunku reakcji można osiągnąć zastępując rozpuszczalnikiem organicznym część lub całość wody w układzie reagującym (5,6,7,8,9), a w krańcowym przypadku prowadząc reakcję bez udziału rozpuszczalnika, jedynie w środowisku substratów (10,11,12).

W ostatnich latach opublikowano wiele prac eksperymentalnych dotyczących enzymatycznej estryfikacji, a także liczne artykuły przeglądowe omawiające działanie enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych (5,13), enzymatyczną syntezę konkretnych estrów (10), biosyntezę lipaz i esteraz oraz ich zastosowanie do syntezy i hydrolizy estrów (14), jak też sposoby tworzenia optymalnych systemów biokatalitycznych enzym – rozpuszczalnik organiczny (15).

Prace doświadczalne w tej dziedzinie koncentrują się na następujących zagadnieniach:

- rozpoznaniu potencjalnych syntetycznych możliwości, lipaz i esteraz oraz zastosowaniu ich preparatów, często produkowanych już w skali przemysłowej, do otrzymywania estrów o znaczeniu użytkowym,
- otrzymywaniu nowych preparatów enzymatycznych o ulepszonych właściwościach katalitycznych (11,16,17,18),
- opracowaniu nowych konstrukcji aparatury do enzymatycznej syntezy i hydrolizy estrów o określonych właściwościach chemicznych i praktycznych (19,20,21),

• badaniu mechanizmu katalizy enzymatycznej w środowisku niewodnym lub difazowym, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu wody i środowiska reakcji na zachowanie katalitycznej konformacji enzymu (5,7,8,22).

Tabela 1

## Przegląd prac doświadczalnych

Kryteria podziału	Literatura
<b>Rodzaj substratu</b>	
<b>alkohole</b>	
alifatyczne I, II i III rzędowe	10, 23, 24, 25
glicerole i glikole	10, 23, 26, 29, 30, 32
alkohole cukrowe i cukry	26, 27, 28, 33
alkohole terpenowe	10, 17, 31, 34, 35
<b>kwasy</b>	
monokarboksylowe C <sub>4</sub> – C <sub>8</sub>	10, 16, 23, 34
dikarboksylowe	10, 23
wyższe kwasy tłuszczowe	10, 16, 23, 25, 30, 76
inne	32, 33, 34
<b>aminy</b>	
wyższych kwasów tłuszczowych	76
<b>Budowa estru</b>	
monoestry	10, 23
poliestry	10, 23
<b>Specyficzność działania enzymu</b>	
szeroka	16, 23, 24, 25
pozycyjna	36, 37, 38, 39, 40
stereospecyficzna	41
enantjoselektywna	32, 34, 35, 42, 43
<b>Typ estryfikacji</b>	
prosta	16, 23, 24, 25, 30
interestryfikacja	32, 40, 39, 44
wewnątrzcząsteczkowa	45, 46, 47, 48, 49
<b>Forma katalizatora</b>	
ciecz	11, 16, 24, 29, 50, 51
ciało stałe	25, 32, 39, 52, 53
<b>Środowisko reakcji</b>	
monofazowe	11, 16, 24, 44, 50, 51
difazowe	23, 26, 54
mikroemulsja	55, 56, 57

W tabeli 1 zamieszczono krótki przegląd prac doświadczalnych, które podzielono w oparciu o główne zagadnienia badawcze, charakteryzujące daną pracę, tj. budowę syntezowanego estru, specyficzność działania enzymu i jego stan skupienia oraz typ środowiska reakcji. Oczywiście jest to podział arbitralny, ponieważ każda z cytowanych prac dotyczy zwykle kilku takich zagadnień.

W dalszych częściach tego artykułu zwrócono uwagę na kluczowe, zdaniem autora, zagadnienie wpływu środowiska reakcji na syntetyczne właściwości lipaz oraz pokrótce omówiono możliwości praktycznego wykorzystania tych enzymów do syntezy estrów.

## 2. Wpływ środowiska reakcji na aktywność lipaz i esteraz

Dlaczego niektóre lipazy i esterazy katalizują syntezę estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych, a inne nie wykazują tej właściwości? Czy powyższa cecha jest wyróżniająca czy też przynależna każdemu enzymowi? Dzięki jakim czynnikom enzym wykazuje właściwości katalityczne w środowisku rozpuszczalnika organicznego?

Obecnie trudno wyczerpująco odpowiedzieć na te pytania.

Wydaje się, że zasadniczym czynnikiem, decydującym o przebiegu reakcji w kierunku syntetycznym jest z jednej strony środowisko samego rozpuszczalnika, niejako „wymuszające” kierunek przemiany, z drugiej zaś szczególne molekularne właściwości enzymu, tj. jego pierwszorzędowa struktura, warunkująca taką konformację cząsteczki, która przynajmniej w obrębie centrum katalitycznego utrzymuje się również w środowisku o stałej dielektrycznej znacznie się różniącej od stałej dielektrycznej wody (58,59,60).

Środowisko reakcji, w którym zachodzi enzymatyczna synteza estrów składa się zazwyczaj z jednego lub kilku rozpuszczalników organicznych, wody oraz rozpuszczonych w nich substratów i produktów reakcji. Jak wpływają te substancje na przebieg reakcji?

Woda stanowi zarówno element środowiska, jak i jeden z produktów reakcji, a jej znaczenie w procesie syntezy estrów należy uznać za kluczowe (rys. 1). W środowisku rozpuszczalników organicznych woda wpływa nie tylko na wartość stałej równowagi reakcji, lecz wysycając hydrofilowe regiony białka utrzymuje jego katalityczną konformację w środowisku hydrofobowym (62). Tworzy ona bardzo ciekłą warstwę zewnętrzną, nie związaną kowalencyjnie z enzymem, lecz stabilizującą jego aktywność katalityczną i dlatego nazywaną warstwą wody niezbędnej (58,59). Ilość wody potrzebną do funkcjonowania enzymu ustalono dla bardzo niewielu biokatalizatorów. Większość takich badań przeprowadzono dotąd dla lizozymu (13,63).



Rys. 1. Rozmieszczenie wody w procesie enzymatycznej syntezy estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych; 1) dotyczy systemów stosujących enzym immobilizowany na nośniku, 2) nie dotyczy układów difazowych i mikroemulsji, 3) dotyczy układu difazowego i mikroemulsyjnego.

Hydratacja białka w środowisku rozpuszczalników organicznych składa się z kilku etapów. Przy stężeniu poniżej 0,07 g wody na 1 g białka, cząsteczki wody oddziałują przede wszystkim z naładowanymi grupami białka, natomiast przy wyższym stężeniu, w zakresie 0,07–0,25 g/g, jej cząsteczki tworzą agregaty pokrywające większą część powierzchni enzymu. Wykazano, że aktywność lizozymu można zmierzyć już przy stężeniu wody 0,2 g/g enzymu, przy którym około połowa powierzchni białka jest pokryta cząsteczkami wody. Przy stężeniu 0,38 g/g lizozymu (około 300 cząsteczek wody na cząsteczkę białka) cząsteczki enzymu są w pełni uwodnione, a aktywność osiąga 10% aktywności w środowisku o stężeniu wody 55,55 M (13,63).

Na aktywność enzymu wywiera wpływ nie tylko wielkość warstwy wody niezbędnej, lecz także obecność w niej dodatkowych jonów i składników. Zaks i Klibanov (73) stwierdzili, że zmiany pH warstwy wody niezbędnej prowadzą do wyraźnych zmian aktywności. Zastąpienie części warstwy wody niezbędnej substancją wykazującą zdolność tworzenia wiązań wodorowych z białkiem, np. formamidem, może znacznie zwiększyć aktywność enzymu (74).

Rozpuszczalnik organiczny, odształcając warstwę wody niezbędnej, może spowodować denaturację enzymu, dlatego też znajomość stężenia wody w środowisku reakcji prowadzonej w takim rozpuszczalniku jest bardzo istotna. Ponieważ bezpośredni pomiar stężenia wody jest w omawianym układzie kłopotliwy, Halling zaproponował wyznaczenie termodynamicznej aktywności wodnej, którą można zmierzyć wyznaczając względną wilgotność zrównoważonej fazy gazowej nad rozpuszczalnikiem (5,64). Znajomość aktywności wodnej ma szczególne znaczenie dla reakcji w systemach dwufazowych, w których przebiega ona na granicy faz woda – rozpuszczalnik organiczny. Jeżeli prowadzi się syntezę w rozpuszczalnikach bezwodnych, wydajność reakcji estryfikacji można zwiększyć usuwając wodę ze środowiska reakcji za pomocą obojętnych chemicznie pochłaniaczy wody, np. sit molekularnych 4Å (61) – rys. 1. W przypadku syntezy zachodzącej w środowisku rozpuszczalnika nasyconego wodą, w układzie difazowym i emulsyjnym, pochłaniacza wody nie stosuje się.

Drugi czynnik środowiska – rozpuszczalniki organiczne – bardzo różnie oddziałują na enzymy. Mogą się one wiązać z enzymem specyficznie i nie dopuszczają do tworzenia kompleksu enzym–substrat, mogą zmieniać stan równowagi katalizowanej reakcji i jej szybkość, mogą też wchodzić z enzymem w reakcję prowadzącą do jego stabilizacji lub destabilizacji (6).

Stwierdzono, że niektóre enzymy są w rozpuszczalnikach organicznych ekstremalnie termostabilne. Przykładowo lipaza z trzustki wieprzowej, która w środowisku wodnym w temperaturze 100°C ulega natychmiastowej inaktywacji, w środowisku tributryloglicerolu zachowuje aktywność ponad 24 godziny (60), zaś lipaza *Mucor javanicus* T45 immobilizowana w mycelium po godzinie ogrzewania w 100°C w rozpuszczalnikach apolarnych (eter naftowy, heksan, dekan) zachowuje aż 70–80% aktywności wyjściowej (75).

W środowisku, jakich rozpuszczalników może przebiegać synteza enzymatyczna i dlaczego? Aby odpowiedzieć na pierwszą część pytania wystarczy przeprowadzić reakcję w różnych rozpuszczalnikach. Odpowiedź na drugą jego część wymaga usystematyzowania rozpuszczalników w oparciu o jakieś kryteria. Niektóre z nich, wywodzące się z fizycznych i chemicznych właściwości rozpuszczalnika, takich jak gęstość, lepkość, stała dielektryczna, punkt krzepnięcia, aktywność protonodonorowa, moment dipolowy, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, polarność, rozpuszczalność w wodzie (6,59,65,66) nie wykazują korelacji z aktywnością enzymu wykazywaną w środowisku danego rozpuszczalnika.

Stwierdzono, że parametrem dobrze opisującym rozpuszczalnik i wykazującym stosunkowo wysoką korelację z aktywnością lipaz działających w takim rozpuszczalniku jest tzw. współczynnik polarności–hydrofobowości, wyrażony jako  $\log P$  (59). Współczynnik ten stanowi sumę hydrofobowych stałych cząstkowych poszczególnych atomów cząsteczki rozpuszczalnika i jest obliczany sposobem podanym przez Harnischa i in. oraz Rekkera i in. (67,68). W pracy Laane i in. (59) zamieszczono wartości  $\log P$  dla 107 najczęściej stosowanych w syntezie bioorganicznej rozpuszczalników. Stwierdzono, że współzależność pomiędzy polarnością rozpuszczalnika

organicznego i aktywnością enzymu wynika ze zdolności do odkształcania przez rozpuszczalnik warstwy wodnej, niezbędnej do stabilizacji katalizatora. Rozpuszczalnik, przenikając do tej warstwy, lub nawet w ostatecznym efekcie usuwając ją, wykazuje zdolność modyfikacji wzajemnych oddziaływań pomiędzy enzymem a cząsteczkami wody.

Analiza wyników Zaksa i Klibanova (69), dotyczących działania różnych lipaz w różnych rozpuszczalnikach organicznych dla reakcji interestryfikacji tributuryloglicerolu i alkoholu heptylowego, dokonana w pracy Laane i in. (59) i polegająca na znalezieniu zależności  $A=f(\log P)$  ( $A$ —aktywność enzymu w środowisku rozpuszczalnika o współczynniku polarności—hydrofobowości  $P$ ), wykazała z dużym prawdopodobieństwem sigmoidalny jej charakter. Zastosowana metoda wyznaczania współczynnika polarności—hydrofobowości nie uwzględniła budowy chemicznej rozpuszczalnika, lecz jedynie jego elementarny skład atomowy, co może prowadzić w przypadku niektórych rozpuszczalników do pewnych odstępstw od znalezionej zależności. Antczak i in. (70) zaobserwowali, iż zależność  $A=f(\log P)$  w reakcji syntezy estrów wyższych kwasów tłuszczowych przez lipazy *Mucor javanicus* T45 i *M. racemosus* A37 wykazuje maksimum, których miejsca występowania były uzależnione od rodzaju substratów i źródła enzymu.

Laane i in. (59) stwierdzili, że orientacyjnym wskaźnikiem zmian aktywności enzymu związanych z odkształcaniem warstwy wody niezbędnej może być rozpuszczalność rozpuszczalników organicznych w wodzie. Stwierdzono, że biokataliza przebiega z niską wydajnością w rozpuszczalnikach organicznych o  $\log P < 2$ , których rozpuszczalność w wodzie jest większa od 0,4%. Rozpuszczalniki takie, m.in. sulfotlenek dimetylu ( $\log P = -1,3$ ), acetonitryl ( $-0,33$ ), aceton ( $-0,23$ ) silnie oddziałują na warstwę wody niezbędnej. W rozpuszczalnikach o  $\log P$  zawartym pomiędzy 2 i 4, których rozpuszczalność w wodzie wynosi 0,4–0,04%, biokataliza przebiega ze średnią wydajnością. Rozpuszczalniki te w małym stopniu zakłócają oddziaływania woda—enzym i mogą wywierać trudny do przewidzenia wpływ na aktywność enzymatyczną. Należą do nich: benzen ( $\log P = 2$ ), pentan ( $\log P = 3$ ), heksan ( $\log P = 3,5$ ), heptan ( $\log P = 4$ ). Biokataliza przebiega z najwyższą wydajnością w rozpuszczalnikach wysoce apolarnych, dla których  $\log P > 4$ , a ich rozpuszczalność w wodzie jest mniejsza od 0,04%. Rozpuszczalniki te, np. oktan ( $\log P = 4,5$ ), dekan (5,6) i heksadekan (8,8), nie odkształcają warstwy wody niezbędnej, pozostawiając tym samym katalizator w stanie aktywnym. W pracy Laane i in. (59) wyprowadzono zależność pomiędzy polarnością substratu ( $\log P_s$ ) i produktu ( $\log P_p$ ) oraz polarnością interfezy (mikrośrodowisko biokatalizatora  $\log P_i$ ) i organicznej fazy ciągłej ( $\log P_{fc}$ ). Stwierdzono, że wyrażenia  $(\log P_i - \log P_s)$  i  $(\log P_{fc} - \log P_p)$  muszą być minimalne, aby zapewnić wysokie stężenia substratu w interfezie i produktu w fazie ciągłej, natomiast wyrażenia  $(\log P_{fc} - \log P_s)$  i  $(\log P_i - \log P_p)$  powinny być maksymalne, aby utrzymać na niskim poziomie stężenia substratu w fazie ciągłej i produktu w interfezie. Cytowani autorzy (59) uważają, że prawdopodobnie wszystkie układy biokatalityczne działające w rozpuszczalnikach organicznych mogą być tą drogą optymalizowane, jak to stwierdzono dla myceli odwróconych, ponieważ powinno być dla nich możliwe obliczenie wartości  $\log P_i$  i  $\log P_{fc}$ . Dla tych układów, które nie zawierają prawdziwej interfezy, takich jak np. enzymy w formie stałej w apolarnych rozpuszczalnikach organicznych,  $\log P_i$  jest taki sam jak  $\log P_{fc}$  i dlatego środowisko reakcji może być optymalizowane tylko w odniesieniu do wartości  $\log P$  i  $\log P_p$ .

Jedynym wyjątkiem, wykazującym inny zakres zależności  $A=f(\log P)$ , jaki dotychczas opisano (59,69), jest lipaza trzustkowa. Enzym ten zachowywał się zupełnie odmiennie w tym sensie, że funkcjonował w praktycznie wszystkich badanych rozpuszczalnikach ( $\log P$  w zakresie od  $-0,5$  do  $+10$ ), co sugeruje silniejsze związanie warstwy niezbędnej wody z molekułą enzymu.

Inada i in. (11) oraz Nishio i in. (16,17) opracowali metodę modyfikacji chemicznej enzymów, umożliwiającą ich rozpuszczenie w środowisku rozpuszczalników organicznych bez utraty aktywnej konformacji. Modyfikacja ta polega na kowalencyjnym związaniu z cząsteczką białka, poprzez grupy aminowe, związków o charakterze hydrofilowo—hydrofobowym, np. glikolu monometoksypolietylenowego. Zmodyfikowana tym sposobem lipaza *Pseudomonas fluores-*

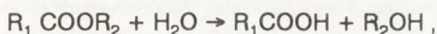
*scensis* była rozpuszczalna i aktywna w środowisku benzenu, chloroformu, 1,1,1-trichloroetanu, toluenu i co więcej, funkcjonowała nadzwyczaj wydajnie także w niskich temperaturach bliskich 0° C oraz wykazywała dużą stabilność w środowisku rozpuszczalników.

### 3. Zastosowanie lipaz do syntezy estrów

Enzymatyczna synteza estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych z udziałem lipaz wykazuje szereg zalet w porównaniu z tradycyjną metodą chemiczną. Można do nich zaliczyć: wysoką specyficzność działania katalizatora, małą ilość produktów ubocznych, niską energochłonność procesu. O zastosowaniu tej metody w większej skali decyduje oczywiście rachunek ekonomiczny. Dużą część kosztów procesu może stanowić cena samego katalizatora; np. w syntezie 2-metylowalerianianu prenylu nakłady na lipazę *Candida cylindracea* OF 360 wynosiły około 60% całkowitych kosztów (10). Mimo to uważa się, że preparaty lipaz i esteraz nie są drogie (42), zwłaszcza dzięki możliwości ich wielokrotnego użycia, wynikającej z częstego stosowania immobilizowanej formy enzymu oraz ze względu na cenę syntetyzowanych przy ich udziale wysoce specyficznych i trudnych do otrzymania innymi metodami estrów. Dzięki różnej specyficzności lipaz, zależnej od pochodzenia enzymu, można je wykorzystywać nie tylko w syntezie różnorodnych estrów, ale też do otrzymywania alkoholi czy kwasów. Związki te, często o budowie warunkującej aktywność biologiczną lub określone cechy użytkowe mogą być otrzymywane na drodze zarówno syntezy, jak też interstryfikacji, a nawet hydrolizy.

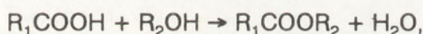
Otrzymanie żądanego produktu może nastąpić w wyniku (71):

1) asymetrycznej hydrolizy



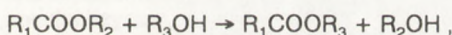
lipaza hydrolizuje jeden z enancjomerów, węgiel chiralny może być w reszcie kwasowej lub alkoholowej,

2) asymetrycznej estryfikacji



węgiel chiralny może być zlokalizowany w alkoholu lub kwasie,

3) asymetrycznej transestryfikacji



chiralny atom węgla może być zawarty w estrze lub alkoholu.

Yokozeki i in. (49) zastosowali jako jedni z pierwszych immobilizowaną lipazę *Rhizopus delemar* w środowisku heksanu do regiospecyficznej interstryfikacji tłuszczów i olejów. Wprowadzając reszty kwasu stearynowego w pozycje 1,3 glicerydu uzyskali namiastkę masła kakaowego, która obecnie jest produkowana na skalę przemysłową (10). Reakcja interstryfikacji katalizowana przez lipazy w bezwodnym środowisku organicznym bywa często wykorzystywana do modyfikacji masła (78) lub regioselektywnej acylacji glicerolu (33). Z zastosowaniem tej właśnie metody produkuje się w skali preparatywnej wiele pierwszorzędowych monoacylogliceroli (52). Lipazy znajdują od kilku lat zastosowanie do rozdzielania racematów alkoholi i kwasów karboksylowych. Asymetryczna hydroliza odpowiednich estrów lub enancjoselektywna estryfikacja mieszanin racemicznych pozwalają uzyskać z wysoką wydajnością żądane enancjomery. Jednym z najczęściej stosowanych do tego celu enzymów jest lipaza *Candida cylindracea* produkowana na skalę przemysłową przez firmę Meito-Sangyo (Japonia), której preparaty w zależności od formy enzymu (rozpuszczalny lub immobilizowany) występują pod nazwami Lipaza OF 360 i Lipaza MY. Kirchner i in. (42) zastosowali tę lipazę oraz trzustkową do otrzymywania estrów różnych, optycznie czynnych alkoholi alifatycznych i R-chlorowcopochodnych kwasów karbo-

ksylowych. Reakcję prowadzono w skali preparatywnej, dodając preparaty enzymatyczne w postaci suchego pudru bezpośrednio do roztworu substratów rozpuszczonych w heksanie. Użytkano wysoką wydajność i stereoselektywność reakcji.

Te same preparaty, tj. Lipaza MY i OF można też stosować w enancjoselektywnej i wysoko-wydajnej (98%) syntezie różnorodnych estrów, np. 2-metylowalerianianu prenylu (10), stosowanego w przemyśle owocowo-warzywnym i perfumeryjnym, a także w enancjoselektywnej estryfikacji dl-mentolu (34,35), estryfikacji pochodnych  $\alpha$ -cykloheksanoli oraz geraniolu (43).

Innym enzymem produkowanym na skalę przemysłową z przeznaczeniem do transestryfikacji i syntezy estrów w środowisku rozpuszczalników organicznych, jest unieruchomiony na anionie preparat lipazy *Mucor miehei* o nazwie Lipozyme IM-20, wytwarzany przez firmę Novo (Dania). Wykazuje on specyficzność względem pozycji 1,3 w acyloglicerolach, a także względem pierwszorzędowych alkoholi alifatycznych. W środowisku rozpuszczalników organicznych czas półtrwania preparatu wynosi  $T_{1/2}=66$  dni. Może być stosowany w zakresie temperatur 60–80°C (36,37,38). Preparat ten w syntezie mirystynianu mirystylu wykazuje produktywność 1,2 tony estru na 1 kg katalizatora (77). Znalazł on także zastosowanie do ciągłej modyfikacji tłuszczu (79).

Ważną grupą związków otrzymywanych na drodze estryfikacji katalizowanej przez lipazy są estry cukrowe. Therisod i Klibanov (27,28) opisali regioselektywną acylację cukrów, zaś Seino i in. (26), zastosowali lipazę *Candida cylindracea* do estryfikacji cukrów i sorbitolu. Lipazy z trzustki i z *Chromobacterium viscosum* Chopineau i in. wykorzystali do otrzymywania detergentów (53) w reakcji transestryfikacji pomiędzy alkoholami cukrowymi a olejami roślinnymi w środowisku pirydyny.

Makrocycliczne laktony są grupą związków obdarzonych piżmowym zapachem i dlatego niezwykle cennych dla przemysłu perfumeryjnego. Można je otrzymać metodą wieloetapowej wysokoenergochłonnej syntezy organicznej lub na drodze jednoetapowej, niskoenergochłonnej syntezy enzymatycznej z udziałem lipaz, np. przez kondensację kwasów dikarboksylowych i dioli (45), laktonizację estrów metyloowych kwasów  $\omega$ -hydroksykarboksylowych (46), laktonizację kwasów  $\omega$ -hydroksykarboksylowych (47,48) lub kwasów  $\gamma$ -hydroksykarboksylowych (49).

#### 4. Uwagi końcowe

O ile wiedza i szczęście w sposób zbliżony decydują o znalezieniu nowego źródła enzymu, o tyle opracowanie optymalnego środowiska reakcji zawierającego rozpuszczalnik organiczny, mimo niewątpliwego w ciągu ostatnich lat postępu w tej dziedzinie, jest ciągle związane z przypadkiem. Z praktycznego punktu widzenia, niemożliwe jest zbadanie wpływu wszystkich rozpuszczalników na aktywność interesującego nas enzymu. Musimy dokonać selekcji, podczas gdy kryteria wyboru rozpuszczalników są dziś jeszcze mało precyzyjne. Określenie optymalnego środowiska reakcji komplikuje fakt, że w dodatku takie środowisko może stanowić mieszanina dwu lub więcej rozpuszczalników. Często również asortyment rozpuszczalników na półce w laboratorium decyduje, które z nich zastosuje się jako potencjalne środowisko reakcji. Równie ważne jak rodzaj rozpuszczalnika są także wzajemne relacje pomiędzy stężeniem substratów, enzymu i rozpuszczalnika w środowisku reakcji (72), co dodatkowo utrudnia jej optymalizację.

Wydaje się, że trudności związane z wyborem rozpuszczalnika i optymalizacją procesu wynikają głównie z faktu, że właściwości enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych bada się w kontekście skutków ich działania (powstały produkt), nie zaś przyczyn, którymi są zmiany konformacyjne enzymu w takim środowisku.

Mimo tych ograniczeń, badania nad działaniem enzymów w środowisku niewodnym rozwijają się bardzo intensywnie i z pewnością tendencja ta będzie się dalej utrzymywać.

Aktywność wielu enzymów w środowisku niewodnym, obok wszystkich walorów poznawczych i praktycznych, prowadzi również do wniosku bardziej ogólnego, można ją bowiem traktować jako pośredni dowód możliwości istnienia życia białkowego, wykorzystującego rozpuszczalnik inny niż woda (6).

## Literatura

1. Enzyme nomenclature, (1984), Academic Press, N.Y., London.
2. Lestrowaia N. N., (1976), *Usp. Mikrobiologii*, 11, 21–40.
3. Entressangles B., Desnuelle P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 285–295.
4. Brockerhoff H., Jensen G., (1974), *Lipolytic enzymes*, London.
5. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513–516.
6. Butler L. G., (1979), *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 253–259.
7. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 76–89.
8. Martinek K., Semenov A. N., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 90–101.
9. Lilly M. D., (1982), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 162–169.
10. Lazar G., Henkel K., (1985), *Fette Seifen Anstrichmittel*, 10, 394–400.
11. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Ajima A., Matsushima A., Saito Y., (1986), *Trends Biotechnol.*, 4, 190–194.
12. Linfield W. M., Barauskas R. A., Sivieri L., Serota S., Stevenson Sr R. W., (1984), *JAOCS*, 61, 191–195.
13. Zaks A., Russell A. J., (1988), *J. Biotechnol.*, 8, 259–270.
14. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 38, 95–110.
15. Khmielnicki Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K., (1988), *Biotechnologia*, 4, 292–308.
16. Nishio T., Takahashi K., Tsuzuki T., Yoshimoto T., Kodera Y., Matsushima A., Saito Y., Inada Y., (1988), *J. Biotechnol.*, 8, 39–44.
17. Nishio T., Takahashi K., Yoshimoto T., Kodera Y., Saito Y., Inada I., (1987), *Biotechnol. Lett.*, 9, 187–190.
18. Baillargron M. W., Sonnet P. E., (1988), *JAOCS*, 65, 1812–1815.
19. Hoq M. M., Tagami H., Yamane T., Shimizu S., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 335–341.
20. Sih Ch., Patent US 4584270.
21. Hoq M. M., Yamane T., Shimizu S., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 236–240.
22. Semenov A. N., Khmelnski Yu. L., Berezin I. V., Martinek K., (1987), *Biocatalysis*, 1, 3–8.
23. Okumura S., Iwai M., Tsujisaka Y., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 575, 156–165.
24. Yukomoto J., Iwai M., Tsujisaka Y., (1963), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 353–361.
25. Knox T., Cliffe, (1984), *Process Biochemistry*, October, 188–192.
26. Seino H., Uchibori T., Nishitani T., Inamasu S., (1984), *JAOCS*, 61, 1761–1765.
27. Therisod M., Klibanow A. M., (1986), *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5638–5640.
28. Therisod M., Klibanow A. M., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3977–3981.
29. Tsujisaka Y., Okumura S., Iwai M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 489, 415–422.
30. Bell G., Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E. L., Todd R., (1978), *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 223.
31. Iwai M., Okumura S., Tsujisaka Y., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2731–2735.
32. Abramowicz D. A., Keese Ch. R., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 149–156.
33. Gobbert U., Schmeichel A., Lang S., Wagner F., (1988), *JAOCS*, 65, 1519–1525.
34. Koshiro S., Sonomoto K., Tanaka A., Fukui S., (1985), *J. Biotechnol.*, 2, 47–57.
35. Langrand G., Baratti J., Buono G., Trinataphylides Ch., (1986), *Tetrahedron Letters*, 27, 29–32.
36. Eigtved P., Hansen T. T., Høge-Jansen B., (1985), *Novo Industry A/S*, A-05924a.
37. Hansen T. T., Eigtvet P., (1985), *Novo Industry A/S*, A-05930a.
38. Eigtvet P., Hansen T. T., Sakaguchi H., (1986), *Novo Industry A/S*, A, 05948.
39. Yokozeki K., Yamanaka S., Takinami K., Hirose Y., Tanaka A., Sonomoto K., Fukui S., (1982), *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 1–5.
40. Holmberg K., Osterberg E., (1988), *JAOCS*, 65, 1544–1548.
41. Ombou B., Klibanov A. M., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1449–1454.
42. Kirchner G., Scollar M., P. Klibanov A. M., (1985), *J. Amer. Chem. Soc.*, 107, 7072–7076.
43. Langrand G., Seechi M., Buono G., Barratti J., Trinataphylides Ch., (1985), *Tetrahedron. Letters*, 26, 1857–1860.
44. Ison A. P., Dunnill P., Lilly M. D., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 47–51.
45. Zhi-Wei G., Sih C. J., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1999–2001.
46. Makita A., Nihira T., Yamada Y., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 805–808.
47. Antczak T., Antczak U., Galas E., Góra J., (1988), *Zgłoszenie patentowe*, P 271947.
48. Antczak U., Antczak T., Galas E., Góra J., Fajfer A., (1989), *Patent tymczasowy*, P 271948.
49. Gutman A. L., Zuobi K., Boltansky A., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 3861–3864.



50. Hoq M. M., Yamane T., Shimizu S., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 236–241.
51. Hoq M. M., Yamane T., Shimizu S., Funda T., Ishida S., (1984), *JAOCS*, 61, 776–781.
52. Mihama T., Yoshimoto T., Ohwada K., Takahashi K., Akimoto S., Saito Y., Inada Y., (1988), *J. Biotechnol.*, 7, 147–160.
53. Chopineau J., McCafferty F., Therisod M., Kilbanov A. M., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 208–214.
54. Semenov A. N., (1983), *Chemiczeska Enzymologija*, red. Berezin I. W., Martinek K., Wyd. Uniwersytetu Moskiewskiego, 91–104.
55. Martinek K., Berezin I.W., Khmelnitski Yu. L., Klyachko N. L., Levashov A. V., (1987), *Biocatalysis*, 1, 9–15.
56. Han D., Rhee J. S., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 381–388.
57. Morita S., Narita H., Matoba T., Kito M., (1984), *JAOCS* 61, 1571–1574.
58. Laane C., (1987), *Biocatalysis*, 1, 17–22.
59. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81–87.
60. Zaks A., Klibanow A. M., (1984), *Science*, 224, 1249–1251.
61. Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E., Akhtar M. W., (1976), *Lipids*, 11, 553–560.
62. Klibanow A. M., Siemienow A. M., Samohin G. D., Martinek K., (1977), *Bioorgan. Chimia*, 4, 82–87.
63. Rupley J. A., Gratton E., Careri G., (1983), *Trends Biochem. Sci.*, 8, 18–22.
64. Cassells J. M., Halling P. J., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 486–491.
65. Ray A., (1971), *Nature*, 231, 313–315.
66. Brink L. E. S., Tramper J., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1258–1269.
67. Harnisch M., Mockel H. J., Schulze G., (1983), *J. Chromatogr.*, 282, 315–322.
68. Rekker R. F., De Kort H. M., (1979), *Eur. J. Med. Chem. Chim. Therapeut.*, 14, 479–485.
69. Zaks A., Klibanov A. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3192–3196.
70. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1987), *Sprawozdanie z pracy 2.3, wykonanej w ramach CPBP 04-11.*
71. Combou B., Klibanov A. M., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1449–1454.
72. Ison A. P., Dunnill P., Lilly M. D., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 47–51.
73. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3194–3201.
74. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 8017–8021.
75. Antczak T., Krystynowicz A., Hiler D., (1990), *Sprawozdanie z pracy 2.3, wykonanej w ramach CPBP 04.11.*
76. Montet D., Pina M., Graille Y., Renard G., Grimaud J., (1989), *Fat. Sci. Technol.*, 91, 14–18.
77. Miller C., Austin H., Posorske L., Gonzalez J. (1988), *JAOCS*, 65, 927–931.
78. Kalo P., Huotari H., Antila M., (1989), *Fat. Sci. Technol.*, 7, 276–281.
79. Posorske L. M., LeFebvre G. K., Miller C. A., Hansen T. T., Glenvig G. L., (1988), *JAOCS*, 65, 922–926.

## Enzymatic synthesis of esthers in organic solvents. Selected problems

### Summary

Water, which is the natural environment of vital processes, is essential for lipases activity *in vivo*, but *in vitro* it can be substituted by an organic solvent. Under these novel conditions lipases exhibit the ability of ester synthesis. The replacement of water with an organic solvent is qualitatively and quantitatively limited because of chemical and physical properties of organic solvents. The qualitative limitations are the consequence of the destruction of catalytic conformation (as a resulting from) polar reactions. The quantitative limitations are also the result of polar reactions which are indirectly expressed as the ability of an organic solvent to mix with water and are realised as the penetration of environmental ingredients to the essential water layer which covers the enzyme molecules. Both the limit and the kind of the penetration directly affect the preservation of the enzyme catalytic conformation.

The indispensable water layer which thermodynamically stabilizes the enzyme molecule in the environment of organic solvent is partially replaced by other environmental ingredients which form hydrogen bonds with functional and active groups of protein i.e. formamide, DMF, pyridine, that in the final consequence may cause an increase of enzymatic activity. In this paper the examples of lipases applications for synthesis of various esthers are described.

### Adres dla korespondencji:

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