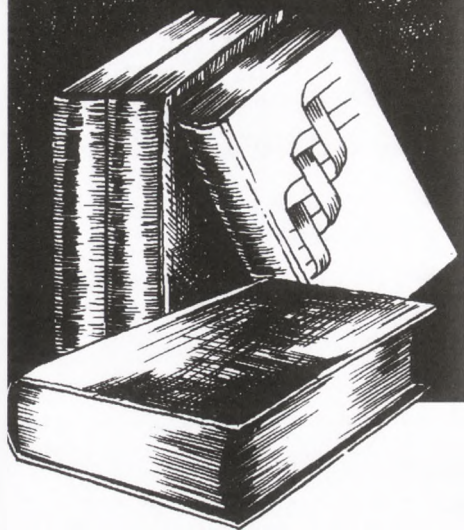




Biotechnologiczne metody otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych.

Część I. Enzymatyczne metody otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych

Włodzimierz Bednarski

Marek Adamczak

Instytut Biotechnologii Żywności

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Olsztyn

1. Wprowadzenie

Wartość rocznej produkcji związków powierzchniowo aktywnych (głównie emulgatorów) jest szacowana na około 9 mld USD (1). Do znanych związków powierzchniowo aktywnych zalicza się między innymi lecytynę, niektóre glikoproteiny oraz mono- i diacyloglicerole. Ich udział w ogólnej masie związków powierzchniowo aktywnych zwiększa się wyraźnie od 1990 r.

Monoacyloglicerole zostały uznane jako całkowicie bezpieczne dodatki do żywności. W przemyśle spożywczym pełnią rolę emulgatorów lub środków żelujących lub pianotwórczych bądź charakteryzują się innymi funkcjami. Stosowane są do modyfikacji skrobi i białek, do kapsułkowania związków



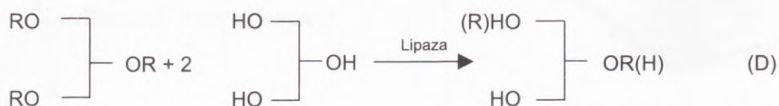
Triacyloglicerol

2-*sn*-monoacyloglicerol

Glicerol

1(2)-*sn*-monoacyloglicerol

Glicerol

1(2)-*sn*-monoacyloglicerol

Triacyloglicerol

Glicerol

1(2)-*sn*-monoacyloglicerol1,2-O-izopropylodieno-*sn*-glicerol

Rys. 1. Możliwości syntezy monoacylogliceroli w wyniku reakcji (A) selektywnej hydrolizy z wykorzystaniem 1,3-*sn*-selektywnej lipazy; (B) estryfikacji kwasu tłuszczowego z glicerolem; (C) estryfikacji estru z glicerolem; (D) glicerolizy; (E) estryfikacji izopropylodienoglicerolu. Produkty takie jak tri- i diacyloglicerole, a także kwasy tłuszczowe zostały pominięte dla zachowania jasności schematu.

smakowo-zapachowych i w produkcji fosfolipidów. Są także używane jako zamienniki tłuszczu w niskotłuszczowych produktach mleczarskich (2). Dotychczas monoacyloglicerole otrzymuje się głównie metodami chemicznymi. Produkcja polega na chemicznej glicerolizie triacylogliceroli z udziałem nieorganicznych katalizatorów (3). Proces prowadzi się w temperaturze 240-260°C. Produktami chemicznej glicerolizy jest mieszanina mono- i diacylogliceroli. Są one koloru ciemnobrunatnego, często o zmienionym, nieprzyjemnym zapachu. Technologia jest energochłonna, a termolabilne składniki

podlegają degradacji. W chemicznej glicerolizie niemożliwe jest zastosowanie jako substratu, np. acylogliceroli kwasów tłuszczowych mono- i polienowych ponieważ w warunkach reakcji (wysoka temperatura) kwasy te polimeryzują.

Synteza monoacylogliceroli w chemicznej glicerolizie jest kilkustopniowa, a wydajność procesu niewielka, około 40%. Trudno jest otrzymać produkty reakcji w postaci czystych izomerów, dotyczy to przede wszystkim 2-monoacylo-*sn*-gliceroli.

Alternatywą chemicznej glicerolizy są procesy enzymatyczne z zastosowaniem lipaz (4-6). Procesy te można przeprowadzić w kilku kierunkach. Monoacyloglicerole powstają jako produkty estryfikacji glicerolu z kwasami tłuszczowymi lub jako produkty hydrolizy lub alkoholizy triacylogliceroli itd. (rys. 1) (7-14).

Enzymatyczna estryfikacja glicerolu z kwasami tłuszczowymi lub z estrami kwasów tłuszczowych prowadzi do otrzymania mieszaniny mono-, di- i triacylogliceroli oraz nieprzereagowanych substratów. Estryfikację można prowadzić w różnych systemach, np. z udziałem lub bez rozpuszczalników (15,16). W celu zwiększenia wydajności estryfikacji i otrzymywania monoacylogliceroli o dużej czystości testowano różne parametry procesu sprzyjające przesunięciu stanu równowagi reakcji. Stwierdzono, że duże znaczenie odgrywa selektywność stosowanych lipaz (17).

Triacyloglicerole są dobrym substratem do otrzymywania 2-monoacylo-*sn*-gliceroli w reakcji hydrolizy lub alkoholizy. Reakcja jest kilkustopniowa, a jej mechanizm przebiega zgodnie ze schematem określanym jako *bi-bi ping pong* (18). Pierwszym etapem reakcji jest deacylacja triacylogliceroli i acylacja enzymu. Acylowany enzym podlega następnie deacylacji, która przebiegać może w wyniku nukleofilowego ataku wody lub alkoholu — wówczas mamy do czynienia odpowiednio z hydrolizą lub alkoholizą.

Jeśli w procesie alkoholizy stosuje się glicerol wówczas reakcja nazywa się enzymatyczną glicerolizą, a produktami reakcji są zarówno 1- jak i 2-monoacylo-*sn*-glicerole (rys. 1B) (19-29).

Celem I części artykułu jest przedstawienie aktualnych kierunków badań zmierzających do opracowania technologii otrzymywania emulgatorów metodami enzymatycznymi. W drugiej części przedstawione będą kierunki badań nad mikrobiologiczną biosyntezą związków powierzchniowo aktywnych.

2. Otrzymywanie monoacylogliceroli w procesie kontrolowanej enzymatycznej hydrolizy triacylogliceroli

Otrzymywanie monoacylogliceroli w wyniku hydrolizy triacylogliceroli wymaga kontroli procesu w celu zapobieżenia całkowitej ich hydrolizy. Częściową, kontrolowaną hydrolizę olejów roślinnych prowadził z powodzeniem Mukherjee i Kiewitt (30,31).

Przykładem postępu w tym zakresie jest zastosowanie *sn*-1,3-selektywnych preparatów lipaz i otrzymywanie 2-monoacylo-*sn*-gliceroli (rys. 1A). Głów-

na wadą tego procesu jest niska wydajność uzyskiwania monoacylogliceroli ponieważ z 1 mola triacylogliceroli powstaje 1 mol monoacylogliceroli. Kolejnym problemem jest konieczność zapobiegania migracji grup acylowych z pozycji *sn*-2 do *sn*-1 lub *sn*-3, co prowadzi do hydrolizy powstających monoacylogliceroli.

W hydrolizie oleju rycynowego z zastosowaniem *sn*-1,3-selektywnej lipazy z *Rhizomucor miehei* Flenker i Spener (32) uzyskali wydajności uwalniania monoacylogliceroli na poziomie 23% (w/w). Poprawę wydajności do 65% (w/w) otrzymano po zastosowaniu dodatku soli, które reagowały z wolnymi kwasami tłuszczowymi.

W przedstawionych przykładach zastosowania hydrolizy enzymatycznej do otrzymywania monoacylogliceroli potwierdza się, że proces ten jest mało wydajny i trudny do optymalizacji i standaryzacji. Korzystniejszą wydajność można otrzymać w procesach estryfikacji lub enzymatycznej glicerolizy.

3. Synteza monoacylogliceroli metodą estryfikacji glicerolu i kwasów tłuszczowych

W reakcjach enzymatycznej estryfikacji lub transestryfikacji niezbędny jest dobór warunków sprzyjających reakcji syntezy i uniemożliwiających hydrolizę. Okazało się, że najważniejszym parametrem jest utrzymanie na niskim poziomie zawartości wody w środowisku (33,34). W praktyce cel ten osiąga się przez dodatek sit molekularnych (35,36) bądź w warunkach podciśnienia (37).

W estryfikacji kwasu oleinowego z glicerolem, w środowisku z dodatkiem sit molekularnych, z wykorzystaniem lipazy z *Penicillium camemberti* uzyskano wydajność syntezy monoacylogliceroli na poziomie 74% (w/w) (35).

W badaniach nad doбором warunków reakcji estryfikacji prowadzonej w kierunku otrzymywania monoacylogliceroli stwierdzono, że wydajność procesu zależy od długości łańcucha estryfikowanego kwasu tłuszczowego oraz od właściwości stosowanych lipaz (38,39). Janssen i wsp. (40) uzyskali wysoką wydajność syntezy monoacylogliceroli (powyżej 60%) w procesie prowadzonym w środowisku rozpuszczalników organicznych z zastosowaniem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Syntezę monoacylogliceroli metodą estryfikacji glicerolu w układzie odwróconych miceli prowadzili Hayes i Gulari (41). W reakcji stosowano *sn*-1,3-selektywną lipazę z *Rhizopus delemar*. Wydajność syntezy monoacylogliceroli wynosiła 50-60%, a głównym produktem reakcji były 1-monoacylo-*sn*-glicerole. Wydajność estryfikacji kwasów tłuszczowych wyraźnie zależała od rodzaju stosowanego kwasu tłuszczowego. Najwyższą — około 30 mmoli monoacylogliceroli uzyskano stosując kwas oleinowy, najniższą poniżej 20 mmoli gdy stosowano kwas stearynowy lub palmitynowy.

Wydajność syntezy monoacylogliceroli w reakcji estryfikacji uzależniona jest również od zastosowanego środowiska reakcyjnego w tym także od rodzaju użytego rozpuszczalnika organicznego. W środowisku *n*-heptanu wy-

dajność syntezy monoacylogliceroli w reakcji estryfikacji wynosiła 72%, a w środowisku z acetonem aż 68% (42). W środowisku płynów nadkrytycznych wydajność syntezy monoacylogliceroli wynosiła 46,1% (43).

W celu poprawy wydajności syntezy monoacylogliceroli zastosowano adsorpcję glicerolu na nośnikach stałych, np. ziemi okrzemkowej (44). W tych warunkach wydajność syntezy monoacylogliceroli wynosiła 70%.

Korzystną wydajność syntezy monoacylogliceroli uzyskano stosując lipazę z *Candida rugosa* immobilizowaną na membranie połączonej z kolumną absorbującą monoacyloglicerole (45). Pozwoliło to na przesunięcie równowagi reakcji oraz uzyskanie wysokiej czystości emulgatorów.

Warunki ciągłej syntezy monoacylogliceroli z wykorzystaniem lipazy z *Mucor miehei* immobilizowanej na mikroporowatej hydrofobowej membranie przedstawili Yamane i wsp. (46) oraz Hoq i wsp. (47). Monoacyloglicerole o 100% czystości otrzymano stosując pochodne glicerolu z zablokowanymi, zestryfikowanymi dwoma grupami hydroksylowymi (48-53). Najczęściej stosowaną w tym celu pochodną glicerolu jest 1,2-O-rac-izopropylodieno-sn-glicerol (rys. 1E). Udoskonaleniem reakcji estryfikacji prowadzonych z 1,2-O-rac-izopropylodieno-sn-glicerolem jest wykorzystanie enolowych lub metylowych estrów. Powstawaniu produktów ubocznych (alkohol winylowy lub izopropylowy) towarzyszą przegrupowania tautomeryczne, które przesuwają równowagę reakcji transestryfikacji i prowadzą do uzyskania wyższych wydajności syntezy monoacylogliceroli (49).

Z przedstawionych informacji wynika, że doskonalenie procesu estryfikacji sprzyja poprawie wydajności syntezy monoacylogliceroli oraz czystości uzyskiwanych produktów. Istnieją realne szanse stosowania tego procesu w praktyce.

4. Enzymatyczna gliceroliza oraz jej zastosowanie

Badania nad enzymatyczną glicerolizą oraz jej zastosowaniem do otrzymywania monoacylogliceroli rozwijają się intensywnie od kilkunastu lat. Wyniki większości badań potwierdzają systematyczną poprawę wydajności syntezy monoacylogliceroli. Początkowo wydajności ich pozyskiwania wynosiły 20-30% obecnie już 70-90% (20-26). Z dostępnych informacji wiadomo że o wydajności otrzymywania monoacylogliceroli decydują przede wszystkim: rodzaj substratu, rodzaj enzymu i jego dawka, temperatura, zawartość wody w środowisku oraz stosunek triacylogliceroli do glicerolu (20-26). Zgodnie z wynikami badań McNeilla i wsp. (20-22) czynnikiem, który w głównej mierze decyduje o wydajności procesu jest temperatura. Ważne jest ustalenie temperatury krytycznej (T_K), tj. takiej poniżej której mamy do czynienia ze znacznym zwiększeniem wydajności reakcji. Wysokość temperatury krytycznej zależy od temperatury topnienia zastosowanego w reakcji tłuszczu.

W enzymatycznej glicerolizie substratami najczęściej stosowanymi są: łój wołowy, olej palmowy, olej kokosowy, olej rzepakowy, a także uwodorniony łój lub smalec (20-26). Wpływ rodzaju substratu na wydajność otrzymywania monoacylogliceroli w reakcji glicerolizy potwierdził McNeill i wsp. (21) (tab. 1).

TABELA 1
WYDAJNOŚĆ GLICEROLIZY RÓŻNYCH TŁUSZCZÓW I OLEJÓW
KATALIZOWANEJ PRZEZ LIPAZĘ Z *Pseudomonas fluorescens* (21)

Substrat	Temperatura topnienia (°C)	Optymalna temperatura (°C) (1)	Początkowa szybkość syntezy monoacylogliceroli (monoacyloglicerole/h) (2)	Maksymalna wydajność syntezy monoacylogliceroli (%)
lój wołowy	46	42	0,14	76
smalec	33	30	0,13	69
tłuszcz mlekowy	30	32	0,09	80
olej palmowy	28	40	0,15	67
oleina palmowa	20	30	0,16	71
stearyna palmowa	52	40	0,18	86
olej kokosowy	25	30	0,05	77
olej rzepakowy	<5	5	0,01	77
olej z oliwek	<5	10	0,02	90
olej kukurydziany	<5	5	0,01	42
uwodorniony lój wołowy	62	50	0,20	39
uwodorniony smalec	59	50	0,12	30

1) temperatura w której uzyskano maksymalną wydajność syntezy monoacylogliceroli,

2) szybkość początkową syntezy monoacylogliceroli oznaczano w warunkach optymalnej temperatury.

TABELA 2
SKŁAD ACYLOGLICEROLI MIESZANINY REAKCYJNEJ PODCZAS GLICEROLIZY ŁOJU WOŁOWEGO
(500 JEDNOSTEK ENZYMU/G TŁUSZCZU; 42°C; 800 RPM;
CZAS INKUBACJI MINIMALNY DO UZYSKANIA STANU RÓWNOWAGI) (22)

Preparat lipazy; producent	Udział (%)					Czas inkubacji (h)
	TAG	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG (1)	WKT	
<i>Pseudomonas</i> sp. (Amano P)	8,2	11,4	5,4	72,6	2,4	25
<i>Pseudomonas</i> sp. (Nagase P)	52,8	13,0	8,0	25,2	1,1	100
<i>Pseudomonas</i> sp. (Amano AK)	6,4	11,1	4,8	76,4	1,3	45
<i>Pseudomonas</i> sp. (Amano CES)	7,3	12,1	5,1	74,3	1,3	29
<i>Candida rugosa</i> (Amano AY)	99,8	0,2	0	0	0	54
<i>Penicillium camembertii</i> (Amano G)	99,4	0,3	0,3	0	0	45
<i>Geotrichum candidum</i> (Amano GC)	99,6	0,3	0,1	0	0	46

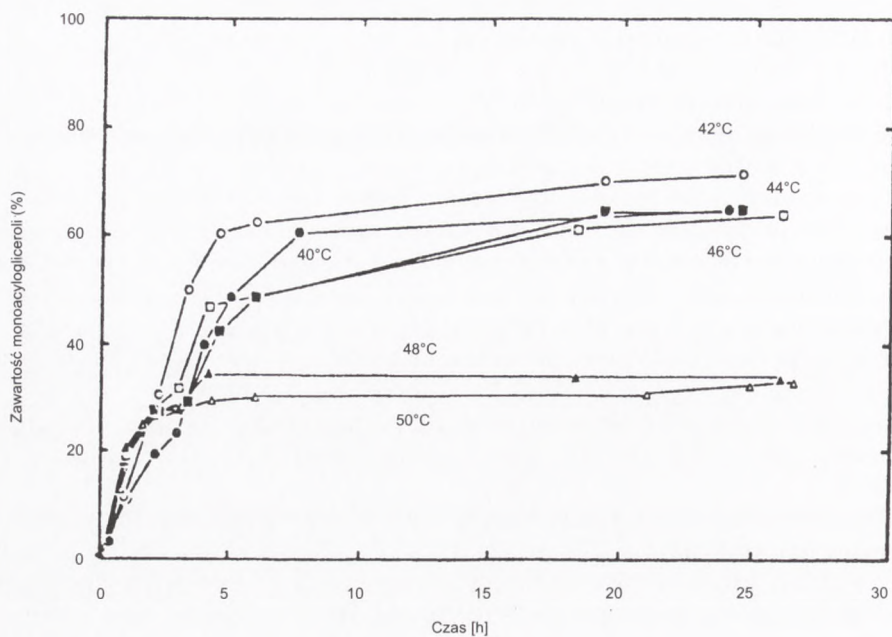
(1) – głównie 1-monoacylo-sa-glicerole; TAG – triacyloglicerole; DAG – diacyloglicerole; MAG – monoacyloglicerole; WKT – wolne kwasy tłuszczowe.

O wydajności glicerolizy oraz o składzie produktów reakcji decyduje również rodzaj zastosowanego enzymu oraz czas reakcji. Potwierdzają to wyniki badań McNeilla i Yamane (22) (tab. 2).

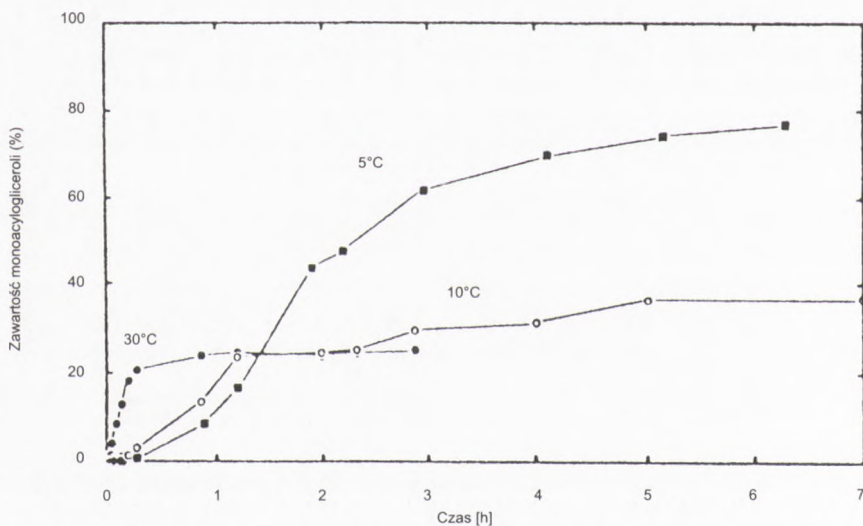
McNeill i Berger (25) stwierdzili zależność pomiędzy kompozycją tłuszczów a wydajnością monoacylogliceroli. Wykazali także, iż krystalizujące monoacyloglicerole są głównie estrami nasyconych kwasów tłuszczowych, a zawartość ich w substratach w granicach 20-80% zapewnia wysoką wydajność syntezy monoacylogliceroli. W optymalizacji warunków reakcji glicerolizy duże znaczenie przypisuje się ustaleniu najkorzystniejszej temperatury. Zadowalające wydajności otrzymywania monoacylogliceroli zapewnia prowadzenie reakcji w dużym zakresie temperatury od 5 do 60°C przez okres od kilkunastu godzin do kilku dni (20-26). Dobre rezultaty otrzymano stosując zmienną temperaturę. W pierwszym etapie reakcję prowadzi się w 40°C przez kilka godzin, a następnie kontynuuje jej przebieg w temperaturze 5°C przez kilka dni (21). Zależność wydajności syntezy monoacylogliceroli od temperatury reakcji glicerolizy potwierdzają wyniki badań McNeilla i wsp. (20,21) (rys. 2, 3).

Rodzaj substratu oraz temperatura reakcji decydują także o proporcjach podstawowych produktów glicerolizy (tab. 3). Temperatura reakcji wpływa także na skład kwasów tłuszczowych w monoacyloglicerolach i diacyloglicerolach otrzymywanych po glicerolizie tłuszczów zwierzęcych lub roślinnych z udziałem lipazy z *Pseudomonas fluorescens* (tab. 4, 5).

Z analizy wyników przedstawionych w tabelach 3, 4 i 5 łatwo zauważyć, że o proporcjach w składzie głównych frakcji produktów glicerolizy jak również o składzie kwasów tłuszczowych otrzymanych mono- lub diacylogliceroli decyduje rodzaj substratu, a ściślej ich temperatura topnienia. Wyniki potwierdzają także słuszność doboru temperatury krytycznej (T_k), parametru decydującego o wydajności reakcji. Łatwo zauważyć różnice w udziale monoacylogliceroli w produktach reakcji glicerolizy prowadzonej w temperaturach 60 lub 40°C (tłuszcze zwierzęce) lub 40°C lub 5°C (oleje roślinne) (tab. 3). Wyższe wydajności monoacylogliceroli uzyskano w temperaturze niższej od T_k .



Rys. 2. Wpływ temperatury na syntezę monoacylogliceroli w reakcji łożu wołowego (20).



Rys. 3. Wpływ temperatury na wydajność syntezy monoacylogliceroli w reakcji glicerolizy oleju rzepakowego (21).

TABELA 3

WYDAJNOŚĆ REAKCJI GLICEROLIZY TŁUSZCZÓW I OLEJÓW PROWADZONYCH Z WYKORZYSTANIEM LIPAZY

Z *Pseudomonas fluorescens* W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY PROWADZENIA PROCESU (24)

Tłuszcz/olej	Udział (% w/w)												
	WKT		MAG			DAG				TAG			
	C16	C18	C16	C18	C16/C18	C30	C32	C34	C36	C48	C50	C52	C54
łój wołowy													
60°C	1,3	1,8	8,2	15,2	0,54	1,1	7,6	19,8	19,9	2,7	7,2	9,6	4,9
40°C	0,8	2,8	28,4	37,7	0,75	0,5	3,8	9,1	14,0	0,3	0,9	1,4	0,4
smalec													
60°C	1,3	3,4	7,6	16,3	0,47	0,5	6,5	19,6	23,9	1,4	5,1	8,8	5,5
40°C	0,6	3,6	26,6	31,1	0,86	0,2	1,4	6,7	18,7	0,2	1,1	3,6	5,2
olej rzepakowy													
40°C	0,2	3,8	1,4	24,5	0,06	0,0	0,0	5,5	44,7	0,3	0,0	2,7	14,9
5°C	0,1	4,0	5,1	59,4	0,09	0,0	0,1	1,3	22,2	0,8	0,0	0,3	6,0
olej sojowy													
40°C	0,5	3,8	2,6	20,7	0,13	0,0	0,6	9,9	38,2	0,0	0,8	6,7	15,8
5°C	0,1	4,4	10,7	30,4	0,35	0,0	0,2	2,0	34,9	0,1	0,0	0,8	16,5

Skład mieszaniny reakcyjnej oznaczono po 24 godzinach (60°C i 40°C) lub po 7 dniach (5°C)

WKT – wolne kwasy tłuszczowe; TAG – triacyloglicerole; DAG – diacyloglicerole; MAG – monoacyloglicerole.

W produktach reakcji (monoacyloglicerole, diacyloglicerole) prowadzonej przez 24 godziny w temperaturze 60°C z tłuszczem zwierzęcym (łój wołowy lub smalec) oraz w 40°C z olejem rzepakowym lub sojowym udział procentowy kwasów tłuszczowych jest bardzo podobny jak w substratach. Analiza kwasów tłuszczowych w monoacyloglicerolach, a szczególnie proporcji C16/C18 w monoacyloglicerolach potwierdzają, że zależy ona od temperatury reakcji. Proporcja ta jest zawsze wyższa przy niższej temperaturze reakcji glicerolizy (tab. 4, 5). Monoacyloglicerole z udziałem kwasów tłuszczowych C16 są najczęściej monopalmitynoiloglicerolami. W składzie frakcji monoacylogliceroli o 18 atomach węgla występują monosterynoiloglicerole oraz monoacyloglicerole zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe. Porównanie składu kwasów tłuszczowych we frakcjach mono- i diacylogliceroli obecnych w produkcji glicerolizy pozwoliło ustalić zależność, że monoacyloglicerole zawierają wyższą zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych niż diacyloglicerole (25,26).

Akumulacji nasyconych kwasów tłuszczowych we frakcji monoacylogliceroli towarzyszy zestalanie mieszaniny reakcyjnej oraz zwiększenie całkowitej zawartości monoacylogliceroli w ogólnej masie produktów glicerolizy. Na tej podstawie można wnioskować, że zwiększona wydajność syntezy monoacylogliceroli przy niższej temperaturze prowadzenia reakcji glicerolizy spowodowana jest głównie przesunięciem równowagi reakcji po krystalizacji monoacylogliceroli zawierających głównie nasycone kwasy tłuszczowe (25,26).

TABELA 4

SKŁAD KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH MONO- I DIACYLOGLICEROLI PO ENZYMATYCZNEJ GLICEROLIZIE
TŁUSZCZÓW ZWIERZĘCYCH W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY PROWADZENIA PROCESU (24)

Tłuszcz	Udział kwasów tłuszczowych (% w/w)								
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	Inne
łój wołowy	3,1	27,3	2,3	22,8	35,0	2,4	0,3	0,3	6,2
60°C									
MAG	3,0	27,3	2,2	21,3	33,2	2,7	0,6	0,2	9,1
DAG	3,0	24,9	2,6	18,9	35,4	3,0	0,4	0,2	11,3
40°C									
MAG	3,0	38,2	1,1	31,6	17,0	1,2	0,2	0,3	7,3
DAG	5,6	15,6	4,2	8,2	49,8	4,1	1,5	0,0	10,0
smalec	1,5	26,4	2,2	17,5	39,0	9,5	0,9	0,3	2,7
60°C									
MAG	1,5	24,5	2,1	14,9	41,1	9,8	1,0	0,4	4,7
DAG	1,3	21,9	2,4	13,4	44,1	11,6	1,2	0,3	3,8
40°C									
MAG	1,7	35,7	1,7	20,6	29,0	6,9	0,8	0,3	3,2
DAG	2,3	19,5	3,2	7,0	49,6	12,8	1,4	0,1	3,8

MAG — monoacyloglicerole; DAG — diacyloglicerole

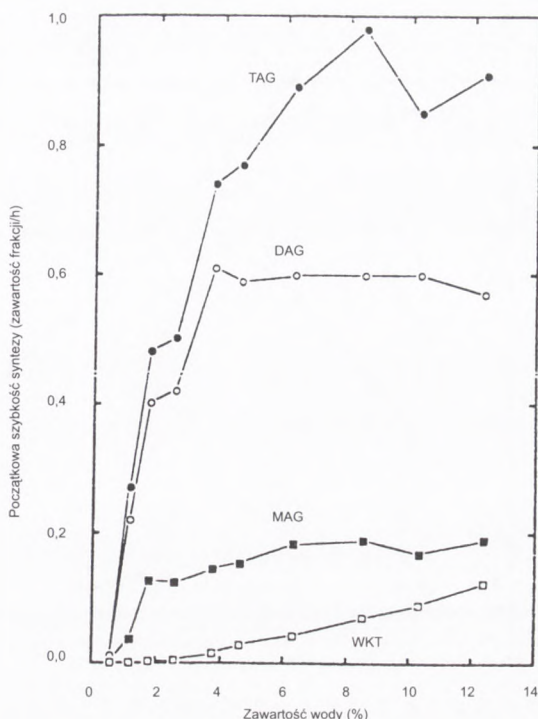
TABELA 5

SKŁAD KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH MONO- I DIACYLOGLICEROLI PO ENZYMATYCZNEJ GLICEROLIZIE
OLEJÓW W ZALEŻNOŚCI OD TEMPERATURY PROWADZENIA PROCESU (24)

Olej	Udział kwasów tłuszczowych (% w/w)								
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	Inne
rzepakowy	0,0	5,0	0,0	1,5	54,7	24,4	11,3	0,6	2,6
60°C									
MAG	0,0	5,2	0,3	1,5	53,1	24,8	12,1	0,6	2,5
DAG	0,0	4,7	0,0	1,3	51,9	25,9	12,9	0,6	2,6
50°C									
MAG	0,1	8,4	0,2	2,4	57,9	17,9	8,8	0,8	3,5
DAG	0,1	1,4	0,3	0,3	45,8	32,6	16,8	0,2	2,6
sojowy	0,0	10,4	0,0	3,6	23,1	55,8	4,5	0,4	2,1
40°C									
MAG	0,0	10,8	0,1	3,5	21,9	55,4	4,9	0,4	3,1
DAG	0,0	9,2	0,0	3,1	21,5	57,2	6,0	0,4	2,7
5°C									
MAG	0,0	26,2	0,0	8,1	18,2	39,4	3,8	0,7	3,5
DAG	0,1	2,1	0,0	0,8	23,1	64,5	5,9	0,1	3,5

MAG — monoacyloglicerole; DAG — diacyloglicerole

Rys. 4. Wpływ zawartości wody na początkową szybkość syntezy MAG-monoacylogliceroli, DAG-diacylogliceroli, TAG-triacylogliceroli, WKT-wolnych kwasów tłuszczowych (20).

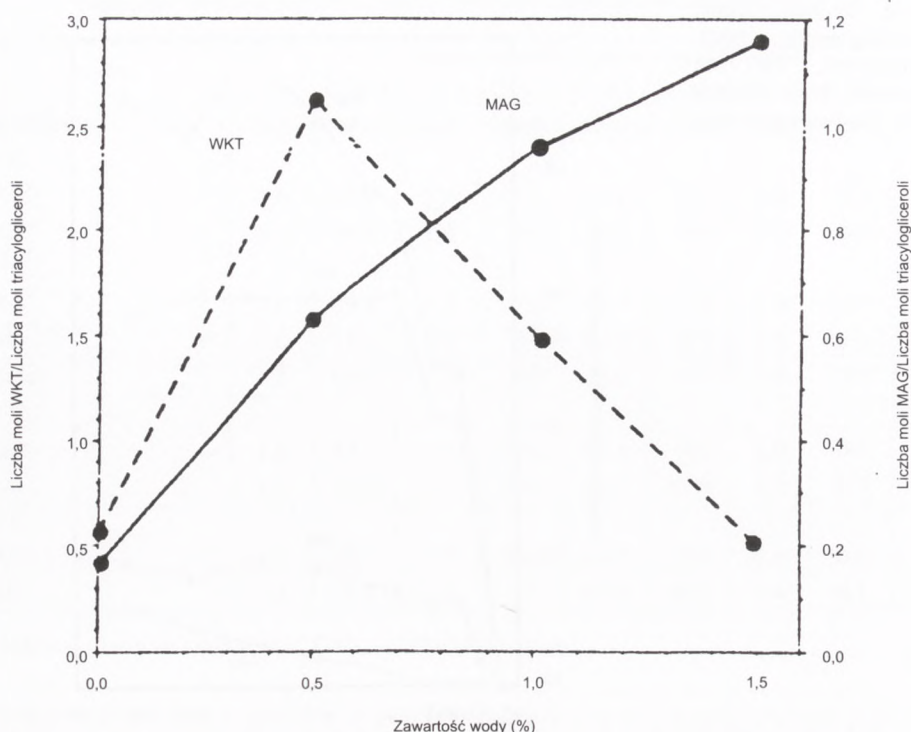


Porównując wydajność syntezy monoacylogliceroli w reakcji glicerolizy (wyrażoną udziałem frakcji mononoacylogliceroli) prowadzonej w 5°C z olejem sojowym lub rzepakowym wyższy udział monoacylogliceroli stwierdzono w produktach reakcji z olejem rzepakowym, mimo że zawiera on mniej kwasów tłuszczowych nasyconych (25).

Z badań McNeilla i wsp. (21) wynika, że prowadząc glicerolizę olejów w 5°C można otrzymać wydajność syntezy monoacylogliceroli na poziomie około 90% oraz zwiększyć w nich udział kwasów tłuszczowych nienasyconych w porównaniu ze składem monoacylogliceroli po glicerolizie smalcu lub łoju wołowego.

Przedstawione zależności pomiędzy wydajnością glicerolizy, składem produktów reakcji a temperaturą prowadzenia procesu i rodzajem substratu potwierdzone zostały w badaniach w których stosowano olej palmowy, stearynowy, oleinian palmowy oraz mieszaninę stearynianu palmowego z olejem rzepakowym (26).

Przebieg reakcji glicerolizy oraz wydajności otrzymywania monoacylogliceroli w dużym stopniu zależą od zawartości wody w środowisku (20) (rys. 4). Początkowe tempo tworzenia monoacylogliceroli zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości wody w środowisku od 0,6 do 2,0% (w biokonwersji łoju wołowego)



Rys. 5. Wpływ zawartości wody w środowisku na tworzenie monoacylogliceroli (MAG) i kwasów tłuszczowych (WKT) z oleju palmowego (19).

oraz od 0,5 do 3,5% (w biokonwersji oleju palmowego). Przekroczenie górnego zakresu zawartości wody w środowisku odpowiednio powyżej 2,0 i 3,5% nie wpływa istotnie na powstawanie monoacylogliceroli. Pomimo że początkowe tempo tworzenia monoacylogliceroli rośnie wraz ze zwiększoną zawartością wody w środowisku to jednak po przekroczeniu jej poziomu 8,5-10,5% (w/w) zmniejsza się wyraźnie wydajność syntezy monoacylogliceroli (20).

Oceniając wpływ zawartości wody w środowisku na wydajność syntezy monoacylogliceroli w układzie mikroemulsji Holmberg i wsp. (19) stwierdzili, że jej minimalny poziom 0,5% (w/w) jest niezbędny do aktywacji enzymu i do rozpoczęcia konwersji triacylogliceroli (rys. 5). W środowisku mikroemulsji ważną okazała się molowa proporcja zawartości bis-(2-etyloheksylo)-sulfo-bursztynianu sodowego (związku powierzchniowo aktywnego) do wody oraz wody do glicerolu. Utrzymując wartości rozpatrywanych parametrów odpowiednio na poziomie 2,5 i 3,4 uzyskano korzystną wydajność syntezy monoacylogliceroli (rys. 5).

Postęp w enzymatycznej glicerolizie wyraża się stosowaniem hydrolaz acyloglicerolowych immobilizowanych. W badaniach Rosu i wsp. (54) lipazę z *Pseudomonas* sp. KW-56 wiązano na: CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ lub na Celicie i z powodzeniem zastosowano w glicerolizie oleju z oliwek. Kończącą zawartość monoacylogliceroli w środowisku reakcji oraz krotność zastosowania immobilizowanych biokatalizatorów przedstawiono w tabeli 6. Na szczególne podkreślenie zasługują wyniki uzyskane z lipazą unieruchomioną na CaCO_3 z uwagi na dostępność i niską cenę wykorzystanego nośnika.

TABELA 6
WYDAJNOŚĆ SYNTEZY MONOACYLOGLICEROLI PODCZAS WIELOKROTNEGO WYKORZYSTANIA
IMMOBILIZOWANEJ LIPAZY Z *Pseudomonas* sp. KWI-56 (54)

Nośnik	Zawrtość monoacylogliceroli po kolejnym wykorzystaniu lipazy (% w/w)					
	I	II	III	IV	V	VI
CaCO_3	87,1	87,0	90,6	88,3	78,7	78,3
Celite	86,9	86,7	60,6	46,6	36,5	37,5
$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	87,5	87,7	88,4	82,5	65,1	29,7
$\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	50,7	63,4	23,4	1,8	–	–

Przedstawione informacje o zastosowaniu enzymatycznej glicerolizy do otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych (głównie mono- i diacylogliceroli) wskazują na szczegółowe ustalenie czynników determinujących wysoką wydajność procesu. Na podstawie wyników uzyskanych z przedstawionych badań realne będzie, jak się wydaje, wdrożenie tych metod do praktyki i w niedalekiej przyszłości całkowite wyparcie glicerolizy chemicznej procesami enzymatycznymi.

5. Enzymatyczna synteza cukrowych estrów kwasów tłuszczowych

Estry cukrowe kwasów tłuszczowych znajdują zastosowanie jako składniki detergentów oraz emulgatory w produktach żywnościowych, tj. produkty niskotłuszczowe, margaryny, sosy, majonezy, lody, itd. (55,56). Enzymatyczna synteza cukrowych estrów kwasów tłuszczowych prowadzona może być w dwojaki sposób:

1. W reakcji katalizowanej przez lipazy prowadzonej w środowisku rozpuszczalników organicznych, zwykle dimetylosulfotlenku bądź pirydyny, rozpuszczalników zapewniających rozpuszczenie substratów (57-61).

2. W wyniku estryfikacji prowadzonej z modyfikowanym substratem cukrowym w środowisku pozbawionym rozpuszczalnika (62-65).

Pomimo konieczności modyfikacji substratu cukrowego, ze względu na wysoką wydajność reakcji częściej stosowana jest właśnie druga metoda.

Jedno z pierwszych doniesień dotyczących acylacji węglowodanów przedstawili Therisod i Klibanov (66). Reakcję pomiędzy cząsteczką węglowodanu a różnymi estrami trichloroetylowymi prowadzono w środowisku bezwodnej pirydyny z wykorzystaniem lipazy trzustkowej. W późniejszej pracy tych autorów przedstawiono możliwość regioselektywnej acylacji drugorzędowych grup hydroksylowych z wykorzystaniem różnych preparatów lipaz (67). Chopineau i wsp. (68) kontynuując badania poprzedników określili warunki estryfikacji alkoholi cukrowych z różnymi tłuszczami. Dla wszystkich badanych alkoholi uzyskano ponad 92% czystość monomerów. Nie stwierdzono wpływu rodzaju użytego tłuszczu na wydajność syntezy estrów alkilowych kwasów tłuszczowych. Potwierdzono natomiast największą przydatność lipazy trzustkowej do prowadzenia tego rodzaju reakcji w środowisku pirydyny.

Oprócz prowadzenia bezpośredniej estryfikacji kwasów tłuszczowych i węglowodanów istnieje także możliwość prowadzenia reakcji transestryfikacji dla uzyskania alkiloglikozydów kwasów tłuszczowych. Mutua i Akoh (69) określili warunki optymalnej transestryfikacji alkiloglikozydów i oleinianu etylu. Po raz pierwszy reakcję prowadzono w środowisku mieszaniny benzen: pirydyna (2:1; v/v) z wykorzystaniem immobilizowanej lipazy z *Candida* sp. Optymalną konwersję kwasu olejowego (58,6-100 mol %) do alkiloglikozydów osiągnięto w temperaturze 55°C, czasie 48 h, przy zachowaniu stosunku molowego alkiloglikozydu do oleinowego metylu 1:4.

Interesujące wyniki osiągnęli Janssen i wsp. (58). Zaproponowali oni estryfikację sorbitolu z kwasami tłuszczowymi wykorzystując lipazę z *Chromobacterium viscosum*, w układzie dwufazowym. Następnie podjęto próbę realizacji procesu z wykorzystaniem reaktora membranowego. Z uwagi jednak na stosunkowo wysoką aktywność wodną w systemie uzyskano niską wydajność reakcji.

Ciągły proces syntezy oleinianu fruktozy zaproponował Khaled i wsp. (59). Uzyskano 83% wydajność procesu po 3-krotnym przepływie reagentów przez złożę preparatu Lipozyme (Novo).

Adelhorst i wsp. (62) zaprezentowali estryfikację glukopyranozydów z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi katalizowaną najwydajniej przez immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica*. Reakcję prowadzono w środowisku pozbawionym rozpuszczalnika, przy wydajności procesu syntezy 6-O-acylglukopyranozydu powyżej 90%. Ze względu na powstającą w czasie reakcji wodę proces prowadzono *in vacuo*. Proces ten w skali przemysłowej realizowany jest przez firmę Novo Nordisk.

Podobny proces syntezy monoestrów węglowodanów i kwasów tłuszczowych w środowisku bez dodatku rozpuszczalników przedstawili Fregapane i wsp. (63). Użyli oni jako materiału wyjściowego izopropylodieno pochodne glukozy. W porównaniu do metody syntezy emulgatorów na bazie alkilowych pochodnych węglowodanów metoda ta jest nieco droższa, ale umożliwia uzyskanie wyższej wydajności i możliwość otrzymywania estrów disacharydów. Pochodne izopropylodienowe ksylozy wykorzystywano również w estryfikacji z kwasem arachidonowym (70). Pozwoliło to na uzyskanie atrakcyjnego produktu — bioemulgatora, a jednocześnie produktu charakteryzującego się korzystnymi walorami żywieniowymi.

Należy nadmienić, że estry cukrowo-tłuszczowe otrzymywane na drodze syntezy enzymatycznej charakteryzują się bardzo dobrymi parametrami redukcji napięcia powierzchniowego, a także stabilizacji układów olej w wodzie (o/w) i woda w oleju (w/o) (71). Wskazuje to na ich przydatność w różnego rodzaju produktach spożywczych.

6. Podsumowanie

W I części artykułu przedstawiono wybrane metody enzymatyczne stosowane w otrzymywaniu związków powierzchniowo aktywnych, głównie mono- i diacylogliceroli. Spośród przedstawionych metod największe szanse zastosowania w praktyce ma gliceroliza enzymatyczna. Przedstawiono także przykłady enzymatycznej syntezy cukrowych estrów kwasów tłuszczowych.

Badania z tego zakresu prowadzone są również w Katedrze Biotechnologii Żywności, UWM w Olsztynie. Dotychczas ustalono warunki glicerolizy łożu wołowego, tłuszczu drobiowego z wykorzystaniem handlowych preparatów hydrolaz acyloglicerolowych oraz otrzymanych w naszym laboratorium. Obecnie pracujemy nad ustaleniem warunków ciągłej glicerolizy z wykorzystaniem lipaz immobilizowanych. Równolegle prowadzimy badania, w których mierzymy do ustalenia warunków biosyntezy związków powierzchniowo aktywnych (bioemulgatorów) przez wybrane szczepy grzybów. Wyniki badań w tym zakresie przedstawione są w II części artykułu.

Literatura

1. Shaw A., (1994), *Soap Cosmet. Chem. Specialities*, 70, 24-34.
2. Boyle E., (1997), *Food Technol.*, 51, 52-54, 56, 58-59.
3. Sonntag N. O. V., (1982), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59, 795A-802A.
4. Berger M., Laumen K., Schneider M. P., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 955-960.
5. Berger M., Schneider M. P., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 961-965.
6. Bornscheuer U. T., Yamane T., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 864-869.
7. Osterberg E., Blomstrom A. C., Holmberg K., (1989), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 1330-1333.
8. Holmberg K., Osterberg E., (1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1544-1548.
9. Kwon S. J., Han J. H., Rhee J. S., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 700-704.
10. Adamczak M., Bednarski W., (1994), *Polish J. Food Nutrit. Sci.*, 3/44, 128-133.
11. Singh C. P., Shah D. O., Holmberg K., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 583-587.
12. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 478-484.
13. Schuch R., Mukherjee K. D., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 332-336.
14. Bornscheuer U. T., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 578-586.
15. Antczak T., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2(29), 73-81.
16. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 2(29), 82-91.
17. Arcos J. A., Otero C., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 673-682.
18. Millqvist A., Adlercreutz P., Mattiasson B., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1042-1047.
19. Holmberg K., Lassen B., Stark M. B., (1989), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 1796-1800.

20. McNeill G. P., Shimizu S., Yamane T., (1990), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 779-783.
21. McNeill G. P., Shimizu S., Yamane T., (1991), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 1-5.
22. McNeill G. P., Shimizu S., Yamane T., (1991), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 6-10.
23. Neill G. P., Yamane T., (1991), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 6-10.
24. McNeill G. P., Borowitz D., Berger R. G., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1098-1103.
25. McNeill G. P., Berger R. G., (1993), *Food Biotechnol.*, 7(1), 75-87.
26. Yamane T., Kang S. T., Kawahara K., Koizumi Y., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 339-342.
27. Bornscheuer U. T., Yamane T., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 864-869.
28. Ferreira-Dias S., da Fonseca M. M. R., (1995), *Bioprocess Eng.*, 13, 311-315.
29. Chang P. S., Rhee J. S., Kim J. J., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1159-1165.
30. Mukherjee K. D., Kiewitt I., (1986), *Phytochemistry*, 23, 349-352.
31. Mukherjee K. D., Kiewitt I., (1986), *Phytochemistry*, 25, 401-404.
32. Flenker J., Spener F., (1990), *DECHEMA-Biotechnology Conference, Part A*, 4, 139-142.
33. Goldberg M., Thomas D., Legoy M. D., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 976-981.
34. Khan S. A., Halling P. J., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 453-458.
35. Yamaguchi S., Mase T., (1991), *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 162-167.
36. Gancet C., (1990), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 613, 600-604.
37. Miller C., Austin H., Posorske L., Gonzalez J., (1988), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 927-931.
38. Ibrahim C. O., Nishio N., Nagai S., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2153-2159.
39. Tahoun M. K., El-Kady M., Wahba A., (1985), *Microbiol. Lett.*, 28, 133-139.
40. Janssen A. E. M., van der Padt A., Van't Riet K., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 953-962.
41. Hayes D. G., Gulari E., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 507-517.
42. Otero C., Pastor E., Rua M. L., Ballesteros A., (1990), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 613, 523-528.
43. Temelli F., King J. W., List G. R., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 699-706.
44. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 478-484.
45. van der Padt A., Keurentjes J. T. F., Sewalt J. J. W., van Dam E. M., van Drop L. J., van't Riet K., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 748-754.
46. Yamane T., Hoq M. M., Shimizu S., (1983), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 434, 558-568.
47. Hoq M. M., Tagami H., Yamane T., Shimizu S., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 335-342.
48. Pecnik S., Knez Z., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 261-265.
49. Bornscheuer U. T., Yamane T., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 193-197.
50. Heidt M., Bornscheuer U., Schmid R. D., (1996), *Biotechnol. Techniq.*, 10, 25-30.
51. Bornscheuer U., Stamatidis H., Xenakis A., Yamane T., Kolisis F. N., (1994), *Biotechnol. Lett.*, 16, 697-702.
52. Hess R., Bornscheuer U., Capewell A., Scheper T., (1995), *Enzymes Microb. Technol.*, 17, 725-728.
53. Ibrahim C. O., Saeki H., Nishio N., Nagai S., (1989), *Biotechnol. Lett.*, 11, 161-166.
54. Rosu R., Uozaki Y., Iwasaki Y., Yamane T., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 445-450.
55. Sarney D. B., Vulfson E. N., (1994), *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59/4b, 2321-2330.
56. Sarney D. B., Vulfson E. N., (1995), *TIBTECH.*, 13, 164-172.
57. Chopineau J., McCafferty F. D., Therisod M., Klivanov A. M., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 209-214.
58. Janssen A. E. M., Klabbers C., Franssen M. C. R., van't Riet K., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 565-572.
59. Khaled N., Montet D., Pina M., Graille J., (1991), *Biotechnol. Lett.*, 13, 167-172.
60. Schotterbeck A., Lang S., Wray V., Wagner F., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 61-64.
61. Oguntimein G. B., Erdmann H., Schmid R. D., (1993), *Biotechnol. Lett.*, 15, 175-180.
62. Adelhorst K., Björkling F., Godtfredsen S. E., Kirk O., (1990), *Synthesis*, 112-115.
63. Fregapane G., Sarney D. B., Greenberg S. G., Knight D. J., Vulfson E. N., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 87-91.

64. Fregapane G., Sarney D. B., Vulfson E. N., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 796-800.
65. Fregapane G., Sarney D. B., Vulfson E. N., (1994), *Biocatalysis*, 11, 9-18.
66. Therisod M., Klibanov A. M., (1986), *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5638-5640.
67. Therisod M., Klibanov A. M., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3977-3981.
68. Chopineau J., McCafferty F. D., Therisod M., Klibanov A. M., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 208-214.
69. Mutua L. N., Akoh C. C., (1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 43-46.
70. Ward O. P., Fang J., Li Z., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 52-56.
71. Ducret A., Giroux A., Trani M., Lortie R., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 109-113.

Biotechnological methods synthesis of surfactants

Part I. Enzymatic synthesis of surfactants

Summary

Surface active agents (surfactants) are generally amphiphilic substances consisting of hydrophobic and hydrophilic moieties. They have many applications in the food, cosmetics, and pharmaceutical industry, pollution control, etc. Lipases (EC 3.1.1.3; acyloglycerol hydrolase) have many applications and they are able to catalyze synthesis of biosurfactants ie. mono- and diacylglycerols, carbohydrate esters of fatty acids etc. These products are biodegradable, natural, non-toxic and acceptable by consumers. In this article enzymatic methods of synthesis of biosurfactants are presented.

Key words:

enzymes, monoacylglycerols, lipases, surfactants.

Adres do korespondencji:

Włodzimierz Bednarski, Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. J. Heweliusza 1, 10-724 Olsztyn-Kortowo.