
Dorđe N. Milićević

Određivanje substratne specifičnosti i ispitivanje prinosa reakcija sinteze mirisnih estara esterifikacijom *Pseudomonas aeruginosa* san ai lipazom

Enzimi kao katalizatori mogu da funkcionišu i u nevodnim sredinama. Enzimi u nevodenoj sredini često se upotrebljavaju u industriji, između ostalog i u sintezi mirišljavih estara, za šta se obično koriste lipaze. Cilj rada bilo je određivanje do sada neispitane substratne specifičnosti Pseudomonas aeruginosa san ai lipaze i određivanje prinosa reakcija nakon različitih vremenskih intervala, od 15 minuta do 72 sata. Substratna specifičnost određivana je spektrofotometrijski, a prinosi reakcija titrimetrijski. Pseudomonas aeruginosa san ai lipaza može da se koristiti za sintezu mirišljavih estara u nevodenoj sredini i pokazuje veću specifičnost ka acetatnim estrima, a najveći prinos dala je u sinteza propil acetata.

Uvod

Enzimi su biomolekuli koji katalizuju hemijske reakcije (Smith 1997). Prisutni su u živim organizmima, gde imaju brojne značajne uloge, a nalaze i veliku primenu u industriji (Klibanov 2001). Polje primene enzima drastično se proširilo nakon otkrića aktivnosti enzima i u nevodenoj sredini (Klibanov 2001). Vodena sredina u mnogome može predstavljati ograničenje za enzime, kako zbog toga što se mnogi substrati ne rastvaraju u vodi, tako iz zbog toga što se u vodenoj sredini često ubrzano odvijaju sporedne reakcije, a i termodinamička ravnoteža mnogih reakcija je u vodenoj sredini nepovoljna. Osim toga, željeni proizvodi reakcije se često teško mogu izolovati iz vodene sredine. Mnogi problemi koje izaziva voda kao medijum za delovanje enzima mogu se

rešiti premeštanjem enzima u organski rastvarač. Enzimi u organskim rastvaračima se, u zavisnosti od udela vode u rastvaraču i drugih parametara, ponašaju znatno drugačije nego u vodenim sredinama, manifestujući pri tom i pojave kao što su enzimska memorija, povećana termostabilnost i izmenjena substratna specifičnost (Gupta 1992). S obzirom da je substratna specifičnost nekih enzima bitno drugačija u nevodnim sredinama u odnosu na vodene (Zaks i Klibanov 1986), javlja se potreba da se substratna specifičnost i prinosi reakcija sinteze odrede za enzime u nevodnim sredinama.

U prirodi, lipaze se nalaze u vodenoj sredini, gde katalizuju razlaganje neutralnih masti do glicerola i viših masnih kiselina (Petrović i Velimirović 2008) i široko su rasprostranjene. Međutim, u nevodnim sredinama pokazuju suprotnu aktivnost, odnosno, mogu sintetisati različite vrste estara (Bezbradica *et al.* 2006), uključujući mirisne (Larios *et al.* 2004) i voštane (Steinke *et al.* 2001). Do sada je ispitana aktivnost mnogih lipaza u nevodenoj sredini, ali u literaturi nema podataka ni o substratnoj specifičnosti, ni o prinosima reakcija sinteze mirisnih estara u nevodenoj sredini *Pseudomonas aeruginosa* san ai lipazom.

Mirisni estri nalaze široku primenu u industriji, kako prehrambenoj, tako i kozmetičkoj. Mogu se proizvesti različitim metodama, među kojima su najzastupljeniji ekstrakcija iz prirodnih materijala i laboratorijska sinteza. Laboratorijska sinteza podrazumeva upotrebu vodenih rastvora kiselina kao katalizatora. Takvi agresivni katalizatori izazivaju brojne probleme u sintezi, kao što su korozija opreme, niski prinosi reakcija, nedostatak selektivnosti i rizici pri rukovanju korozivnim kiselinama. Takođe, reakcija je reverzibilna, što izaziva dalje komplikacije u procesu sinteze. Druga često korišćena metoda je ekstrakcija iz biljnih materijala, koja je skupa i daje male količine estara. Mane komercijalno korišćenih metoda upotunjene rastućom svešću o potrebi za za-

Dorđe N. Milićević (1990), Beograd, Dimitrija Tucovića 83, učenik 3. razreda Šeste beogradske gimnazije

štitom životne sredine i važnosti bezbednosti u industriji hrane, uzrokovale su brojna istraživanja enzimske sinteze mirisnih estara.

Cilj ovog rada bio je određivanje substratne specifičnosti *Pseudomonas aeruginosa* *san ai* lipaze u nevedenoj sredini i ispitivanje prinosa reakcije sinteze mirisnog estera, prema kojem je lipaza pokazala najveću specifičnost.

Materijal i metode

Određivanje substratne specifičnosti

Substratna specifičnost je ispitana kroz sintezu osam različitih estara (tabela 1). Efikasnost sinteze estara ispitivana je merenjem promena koncentracija kiselina, koje su određivane spektrofotometrijski (Kwon i Rhee 1986). Reakcionu smesu za ispitivanje substratne specifičnosti činili su karboksilna kiselina i alkohol u količinskom odnosu 1:1, ukupne zapremine 1200 μ L. Reakciju je preko noći katalizovalo 90 μ L enzima. Za slepu probu korišćen je ekvimolarni rastvor kiseline i alkohola, ukupne zapremine 1200 μ L, bez enzima. Bojena reakcija dobijena je pomoću 90 μ L bakarnog reagensa (Kwon i Rhee 1986).

Tabela 1. Korišćene kombinacije kiselina i alkohola za ispitivanje substratne specifičnosti lipaze

	Kiselina	Alkohol	Estar
1	Salicilna kiselina	Metil alkohol	Metil salicilat
2	Mravlja kiselina	Etil alkohol	Etil formijat
3	Sirćetna kiselina	n amil alkohol	Amil acetat
4	2-naftol	Metil alkohol	Metil naftolat
5	Sirćetna kiselina	Etil alkohol	Etil acetat
6	Sirćetna kiselina	n propil alkohol	Propil acetat
7	Sirćetna kiselina	Metil alkohol	Metil acetat

Ispitivanje prinosa esterifikacije

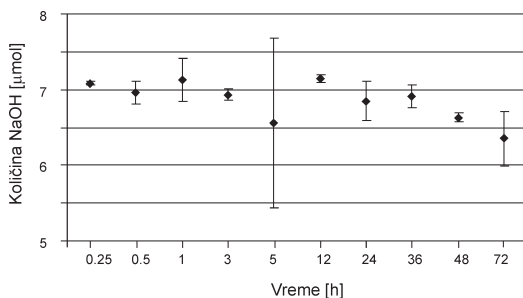
Reakcionu smesu za ispitivanje prinosa esterifikacije činili su 10.2 mL karboksilne kiseline i alkohola u količinskom odnosu 1:1 i 400 μ L rastvora enzima. Deset puta, u različitim vremenskim intervalima, uzimano je po 100 μ L uzorka i razblaživano u po 50 mL destilovane vode. Uzorci iz reakcione smese za određivanje prinosa reakcija uzimani su nakon 15 min, 30 min, 1, 3, 5, 12, 24, 36, 48 i 72 sata od trenutka započinjanja katalitičke reakcije. Reakcija u uzorcima bila je zaustavljena hlađenjem u zamrzivaču. Koncentracija kiselina u alikvotama određena je titrimetrijski (Savić i Savić 1987), pomoću NaOH koncentracije 0.1004 M.

Rezultati i diskusija

Merenjem apsorbanci reakcionih smesa u odnosu na slepu probu, pokazano je da je najveći prinos reakcije bio u slučaju propil acetata, kada je 23% sirćetne kiseline prevedeno u estar. Manje prinose su imali, redom, metil acetat (20%), amil acetat (19%) i etil acetat (12%). Metil salicilat, etil formijat i metil naftolat nisu sintetisani lipazom. Zajedničko reakcijama u kojima su sintetisani produkti je da je u njima učestvovala sirćetna kiselina. U reakcijama koje su dale nulti prinos učestvovala su druge kiseline: salicilna, 2-naftol i mravlja. Prinosi reakcija sinteze acetatnih estara su najveći kod alkohola sa tri (propil alkohol), jedan (metil alkohol) i pet (n amil alkohol) C-atoma, tako da su neophodna dalja ispitivanja, odnosno ispitivanja sa većim brojem alkohola, da bi se zaključilo prema kojim od njih ova lipaza pokazuje najveću specifičnost.

Zbog visokih prinosa sinteze propil acetata u prethodnom eksperimentu, a radi bolje karakterizacije esterifikacije lipazom *Pseudomonas aeruginosa san ai*, ispitana je i zavisnost prinosa od dužine trajanja reakcije sinteze propil acetata. Grafički su prikazane količine utrošenog NaOH za neutralizaciju masnih kiselina u 100 μ L reakcione smese (slika 1).

Tokom vremena, povećava se količina sintetisanog estera, a može se pretpostaviti da su odstupanja od pravilnog povećavanja količine sintetisanog estera, kao što je slučaj za 6. uzorak, posledica grubosti primenjene metode.



Slika 1. Količina utrošenog NaOH u zavisnosti od vremena

Figure 1. NaOH consumption vs time

Zaključak

Rezultati pokazuju da se lipaza *Pseudomonas aeruginosa san ai* može koristiti za sintezu mirisnih estara, kao i da pokazuje veću specifičnost ka acetatnim estrima.

Takođe, na osnovu eksperimentalnih podataka, može se zaključiti da se protokom vremena povećava količina sintetisanog propil acetata.

Dalja istraživanja bi trebalo da detaljnije ispitaju parametre koji utiču na katalitičko ponašanje enzima *Pseudomonas aeruginosa san ai* lipaze, kao što su: strukturne karakteristike substrata na većem broju kiselina i alkohola, početna koncentracija vode, optimalna temperatura i koncentracija enzima.

Zahvalnost. Zahvaljujem se na velikoj pomoći, strpljenju i volji da me uči pravilima rada u laboratoriji Vladanu Martinoviću. Zahvaljujem se, takođe, dr Nenadu Milosaviću na tome što mi je omogućio izvođenje projekta, kao i na instrukcijama kojima mi je pomogao da uspešno dođem do rezultata.

Literatura

Bezbradica D., Karalazić I., Ognjanović N., Mijin D., Šiler-Marinković S., Knežević Z. 2006. Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media. *J. Serb. Chem. Soc.*, **71**: 31.

Gillies B., Yamazaki H., Armstrong D.W. 1987. Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotechnol. Lett.*, **10**: 709.

Gupta M. N. 1992. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.*, **203**: 25.

Klibanov A. M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **409**: 241.

Kwon D. Y., Rhee J. S. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *JAOCS*, **63**: 89.

Larios A., Garcia H. S., Oliart R. M., Valerio-Alfaro G. 2004. Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**: 373.

Petrović J., Velimirović S. 2008. *Hemija za IV razred gimnazije*. Beograd: Zavod za udžbenike

Savić J., Savić M. 1987. *Osnovi analitičke hemije*. Sarajevo: Svjetlost

Smith A.D. 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Oxford University Press

Steinke G., Weitkamp P., Klein E., Mukherjee K. D. 2001. High-Yield Preparation of wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from *Crambe* and *Camelina* Oils. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 647.

Zaks A., Klibanov A. M. 1986. Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**: 2767.

Djordje Milićević

Substrate Specificity and Reaction Rates of *Pseudomonas aeruginosa san ai* Lipase Catalysed Synthesis of Fragrance Esters

Enzymes are biomolecules which catalyse chemical reactions. They can be found in living organisms, catalysing a variety of reactions, but they also play an important role in industry (Klibanov 2001). The number of reactions in industry catalysed by enzymes has increased prominently since the discovery that enzymes may function in non-aqueous solutions as well (Klibanov 2001). Enzymes in non-aqueous solutions exhibit new features, such as enzyme memory, increased thermostability and different substrate specificity.

Fragrance esters have many applications, some of them in the food and cosmetic industry. Although there are several methods for ester synthesis, the need for natural esters is increased. Some consider esters synthesized by enzymes can be labeled “natural” (Gillies *et al.* 1987), which is why fragrance esters synthesis has an industrial application.

The aim of this work was to determine substrate specificity of *Pseudomonas aeruginosa* *san ai* lipase in non-aqueous solution and reaction rates. Chemicals used: acetic acid, formic acid, salicylic acid, 2 naphthol, methyl alcohol, ethyl alcohol, n amyl al-

cohol, copper sulphate-pentahydrate, copper acetate, pyridine. The reactions were stopped by cooling the solutions in a refrigerator. Substrate specificity was determined using a spectrophotometric method (Kwon and Rhee 1986). Concentration of fatty acids in aliquots was determined titrimetrically (Savić and Savić 1987).

Results show that *Pseudomonas aeruginosa san ai* lipase can be used for synthesis of fragrance esters in non-aqueous solutions and that it shows greater specificity towards acetic esters, most of all propyl acetate.

