



## Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne

Tadeusz Antczak, Joanna Graczyk

Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

### Lipases: resources, structure and catalytic properties

#### Summary

Properties of lipases, which not only hydrolyze lipids in aqueous solutions, but are also active in nonaqueous systems, have attracted interest of many researchers. The presented dissertation contains a review of publications devoted to synthesis and classification of microbial lipases, both intra- and extracellular ones. Types of reactions catalyzed by these enzymes, their specificity, mechanism of reaction, molecular background of the interfacial activation, and an influence of the reaction medium on their properties are discussed.

#### Key words:

lipases, reaction milieu, catalytic properties, interfacial activation.

### 1. Wstęp

Potoczna nazwa *lipazy* dotyczy hydrolaz acyloglicerolowych (EC 3.1.1.3) (1,2). Są to hydrolazy estrów glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych. Odgrywają one istotną rolę w przemianach lipidów, które zachodzą w organizmach żywych.

Pozytywne wyniki badań ostatnich dziesięciu lat dotyczące poszukiwania nowych źródeł pozyskiwania lipaz, poznania ich właściwości oraz opracowania efektywnych metod ich otrzymania zwiększyły zainteresowanie tą grupą biokatalizatorów. Perspektywy wykorzystania lipaz w procesach biotechnologicznych (w tym, biotransformacji i biokonwersji) są szerokie, albowiem enzymy te wykazują aktywność katalityczną zarówno w wodzie jak i w środowisku rozpuszczalników niewodnych oraz mogą, w tych

#### Adres do korespondencji

Tadeusz Antczak,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź;  
e-mail:  
tad45an@snack.p.lodz.pl

**biotechnologia**

2 (57) 130–145 2002

środowiskach, katalizować reakcje hydrolizy i syntezy estrów, amidów, estrów tio-  
lowych i wodoronadtlenków (3). W roku 1997 ukazało się około 700-800 publikacji  
i patentów dotyczących lipaz (3). Zainteresowanie tą tematyką nie słabnie, choć  
jego akcenty przesunęły się w kierunku zastosowania preparatów lipaz jako regio-  
i stereoselektywnych katalizatorów w syntezie chemicznej (4,5).

## 2. Źródła lipaz

Źródłem lipaz mogą być mikroorganizmy, organy zwierząt i rośliny (3,4,6,7).  
Większość obecnie wytwarzanych na świecie preparatów lipaz stanowią enzymy  
drobnoustrojowe (4). Lipazy pozakomórkowe (2,8-15) ze względu na łatwość wy-  
dzielania z cieczy pochodowlanej poznane są znacznie lepiej niż lipazy wewnątrzko-  
mórkowe (16-21). Badania właściwości lipaz wewnątrzkomórkowych są utrudnione,  
ponieważ wydzielenie tych enzymów z komórki jest często kłopotliwe.

Zdolność mikroorganizmów do biosyntezy lipaz (zarówno poza- jak i wewnątrz-  
komórkowych) oraz katalityczne właściwości tych enzymów zależą w dużym stop-  
niu od składu podłoża hodowlanego. W wielu pracach podkreśla się istotny wpływ  
na wytwarzanie lipaz substancji tłuszczowych pochodzenia roślinnego, np. z mąki  
sojowej, ekstraktu sojowego bądź tłuszczów zwierzęcych. Lipidy z tego samego  
źródła dodawane do podłoża hodowlanego mogą być inhibitorami lub aktywatorami  
biosyntezy w zależności od rodzaju drobnoustroju wytwarzającego enzym  
(8,22,23).

Obecnie na rynku dostępnych jest około 70 preparatów lipaz (tab. 1). Preparaty  
te pochodzą z różnych źródeł oraz różnią się aktywnością, specyficznością i stanem  
skupienia.

Tabela 1

Wybrane przykłady komercyjnie dostępnych lipaz (3,4,25-27)

Źródło lipazy	Inna nazwa mikroorganizmu	Symbol	Nazwa preparatu (producent)
1	2	3	4
<b>Lipazy zwierzęce</b>			
trzustka: lipaza trzustkowa		PPL	Chirazyme®L-7 (Amano, Boehringer Mannheim), (Fluka, Sigma)
trzustkowa esteraza cholesterolowa		–	(Genzyme, Sigma)
<b>Lipazy grzybowe</b>			
<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	CRL	ChiroCLEC-CR (Altus Biologics), lipaza AY (Amano), lipaza MY, lipaza OF-360 (Meito Sango), Chirazyme®L-3 (Boehringer Mannheim)

1	2	3	4
<i>Geotrichum candidum</i>		GCL	
<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	HLL	Chirazyme®L-8 (Boehringer Mannheim), SP 524, Lipolase®, (Novo Nordisk)
<i>Penicillium camemberti</i>	<i>P. cyclospium</i>	PcamL	Lipaza G (Amano)
<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	RJL	Lipaza M (Amano), Lipaza pozakomórkowa (Fluka)
<i>Rhizomucor miebei</i>	<i>Mucor miebei</i>	RML	Chirazyme®L-9 (Boehringer Mannheim), MAP (Amano), SP 523, Lipozyme® (Novo Nordisk), (Fluka)
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Mucor javanicus</i>	–	(Instytut Biochemii Technicznej, PL)
<i>Mucor racemosus</i>		–	(Instytut Biochemii Technicznej PL)
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>R. javanicus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. niveus</i>	ROL	Lipaza F, D, N (Amano, Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo Co)
<i>Candida antarctica</i> A		CAL-A	Chirazyme®L-5 (Boehringer Mannheim), SP 526 (Novo Nordisk)
<i>Candida antarctica</i> B		CAL-B	Chirazyme®L-2 (Boehringer Mannheim), SP 525, Novozym 435 (Novo Nordisk, Sigma) <sup>a</sup>
<i>Aspergillus niger</i>		ANL	Lipaza A, AP (Amano), Palatase® (Röhm, Novo Nordisk)
<i>Candida lipolytica</i>		CLL	Lipaza L(Amano)
<i>Penicillium roquefortii</i>		ProgL	Lipaza R (Amano)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		–	Cutinase (Unilever)
<b>Lipazy bakteryjne</b>			
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> <sup>b</sup>	PCL	ChiroCLEC-PC (Altus Biologics), P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S (Amano), Chirazyme®L-1 (Boehringer Mannheim), SAM-II (Fluka), (Sigma)
<i>Pseudomonas cepacia</i>		PCL-AH	Lipaza AH (Amano)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		PFL	Lipaza AK, lipaza YS (Amano), (Biocatalysts Ltd.)
<i>Pseudomonas fragi</i>		PfragiL	Lipaza B (Wako Pure Chemical Osaka)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>	CVL	(Sigma, Genzyme, Asahi Chemical, Biocatalysts Ltd.)
<i>Pseudomonas</i> sp.		–	K-10 (Amano)
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>		BTL2	(Boehringer Mannheim)
<i>Alcaligenes</i> sp.		–	Lipaza QL (Meito Sangyo)

<sup>a</sup> Sp525 jest proszkiem zawierającym 40% białka, podczas gdy Novozym 435 jest tym samym enzymem immobilizowanym na mikroporowatym polipropylenie. Firma Novo Nordisk oferuje lipazę SP 383 z *Candida* sp., która jest mieszaniną lipazy A i B z *C. antarctica*.

<sup>b</sup> We wcześniejszych pracach sklasyfikowano mikroorganizm, z którego otrzymano lipazę jako *Pseudomonas fluorescens*, później *Pseudomonas cepacia*, ostatnio jako *Burkholderia cepacia*.

### 3. Struktura i klasyfikacja lipaz

Lipazy są glikoproteinami o masie cząsteczkowej od 20 kDa do 80 kDa. Zawierają od 2 do 15% węglowodanów (4), w których składzie stwierdzono obecność mannozy.

Pomimo że poznane dotychczas lipazy znacznie różnią się sekwencją aminokwasów w części białkowej, posiadają one podobne struktury przestrzenne (4,28-30). Są to hydrolazy zawierające osiem, zazwyczaj równoległych, struktur  $\beta$ -wałdowych otoczonych z obu stron przez  $\alpha$ -helisy. Enzymy te należą do serynowych esteraz, które w centrach aktywnych posiadają triadę aminokwasów katalitycznych: serynę, histydynę i kwas asparaginowy lub glutaminowy oraz kilka reszt aminokwasów stabilizujących powstający w czasie reakcji intermediat – oksyanion. Do niedawna lipazy były uważane za enzymy o hydrofobowych właściwościach, ze względu na ich oddziaływanie z niepolarnymi substratami. Poznanie ich składu aminokwasowego wykazało, że są to białka nie zawierające więcej hydrofobowych aminokwasów niż inne. Do ich oddziaływania z nierozpuszczalnymi w wodzie substratami dochodzi dzięki istnieniu w cząsteczce lipazy tzw. „miejsc hydrofobowych”.

Stwierdzono, że enzymy te można sklasyfikować w grupy, charakteryzujące się zbliżoną sekwencją aminokwasów. Do takich należy np. grupa lipaz trzustkowych. Wśród lipaz grzybowych podobną sekwencję aminokwasów posiadają lipazy wytwarzane przez *Candida rugosa* i *Rhizomucor*. Z kolei, u bakterii podobne lipazy identyfikowane są w *Pseudomonas* i *Staphylococcus*. Pełną klasyfikację lipaz, zgodną z kryterium podobieństwa sekwencji aminokwasów, zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2

#### Klasyfikacja lipaz w oparciu na sekwencji aminokwasów (4,28,29)

„Rodziny” lipazy	Masa cząsteczkowa	Symbol lipazy <sup>a</sup>
<b>Lipazy zwierzęce</b>		
lipazy trzustkowe	50 kDa	PPL
<b>Lipazy grzybowe</b>		
typu <i>Candida rugosa</i>	59-65 kDa	CRL, GCL, CE
typu <i>Rhizomucor</i>	29-42 kDa	CAL-B, RML, ROL, PcamL, HLL
nie sklasyfikowane		ANL, CAL-A, CLL,
<b>Lipazy bakteryjne</b>		
typu <i>Pseudomonas</i>	30-35 kDa	PCL, PFL, CVL
typu <i>Staphylococcus</i>	68-73 kDa	BTL2

<sup>a</sup> symbole lipaz jak w tabeli 1.

#### 4. Reakcje katalizowane przez lipazy

Okazało się, że *in vitro* w medium niewodnym lipazy katalizują także takie reakcje, które nie zachodzą w komórce. Są to biegnące oddzielnie, następczo lub równolegle reakcje otrzymywania lub hydrolizy estrów innych niż triacyloglicerole, estrów tiolowych, amidów i wodoronadtlenków kwasów karboksylowych. Spektrum reakcji, które mogą być katalizowane przez lipazy zawarto w tabeli 3.

Tabela 3

Reakcje katalizowane przez lipazy

Nr	Rodzaj reakcji	Schemat reakcji
1	hydroliza estrów	$R_1\text{COOR}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow R_1\text{COOH} + R_2\text{OH}$
2	synteza estrów	$R_1\text{COOH} + R_2\text{OH} \leftrightarrow R_1\text{COOR}_2 + \text{H}_2\text{O}$
3	transestryfikacje:	
3a	interestryfikacja	$R_1\text{COOR}_2 + R_3\text{COOR}_4 \leftrightarrow R_1\text{COOR}_4 + R_3\text{COOR}_2$
3b	alkoholiza	$R_1\text{COOR}_2 + R_3\text{OH} \leftrightarrow R_1\text{COOR}_3 + R_2\text{OH}$
3c	acydoliza	$R_1\text{COOR}_2 + R_3\text{COOH} \rightarrow R_3\text{COOR}_2 + R_1\text{COOH}$
4	hydroliza amidów	$R_1\text{CONHR}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow R_1\text{COOH} + R_2\text{NH}_2$
5	synteza amidów	$R_1\text{COOH} + R_2\text{NH}_2 \leftrightarrow R_1\text{CONHR}_2 + \text{H}_2\text{O}$
6	aminoliza	$R_1\text{COOR}_2 + R_3\text{NH}_2 \rightarrow R_1\text{CONHR}_3 + R_2\text{OH}$
7	hydroliza estrów tiolowych	$R_1\text{COSR}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow R_1\text{COOH} + R_2\text{SH}$
8	synteza estrów tiolowych	$R_1\text{COOH} + R_2\text{SH} \leftrightarrow R_1\text{COSR}_2 + \text{H}_2\text{O}$
9	synteza wodoronadtlenków kwasów karboksylowych	$\text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{RCOO-OH} + \text{H}_2\text{O}$

#### 5. Specyficzność lipaz

##### 5.1. Specyficzność lipaz w reakcjach przemian tłuszczów prostych

Specyficzność lipaz związana jest ze środowiskiem działania oraz chemiczną budową substratu. Ze względu na regioselektywność w stosunku do położenia wiązań estrowych hydrolizowanych w triacyloglicerolach lipazy (tab. 4) dzieli się na:

- sn-1,3-specyficzne (hydrolizujące wiązania estrowe w pozycji  $R_1$  lub  $R_3$  triacyloglicerolu),
- sn-2-specyficzne (specyficzne w stosunku do  $R_2$  triacyloglicerolu),
- niespecyficzne (hydrolizujące wiązanie estrowe w dowolnym położeniu triacyloglicerolu).

Tabela 4

## Regioselektywność niektórych lipaz w reakcjach hydrolizy i transestryfikacji triacylogliceroli (4)

Lipaza – symbol	Regioselektywność
ANL	średnio sn-1,3-selektywna
CAL-B	sn-1,3-selektywna
CAL-A	nieselektywna lub sn-2
CRL	nieselektywna
CLL	średnio sn-1,3-selektywna
CVL	średnio sn-1,3-selektywna
GCL	nieselektywna
HLL	mało sn-1,3-selektywna
RJL	mało sn-1,3-selektywna
PPL	sn-1,3 -selektywna
PcamL	wysoko sn-1,3-selektywna
ProgL	średnio sn-1,3-selektywna
PCL	nieselektywna
PFL	nieselektywna lub sn-1,3-selektywna
ROL (Amano D)	wysoko sn-1,3-selektywna
ROL (Amano N)	wysoko sn-1,3-selektywna
RML	średnio sn-1,3-selektywna

Specyficzność substratowa lipaz jest uzależniona także od budowy reszty acylowej acyloglicerolu. Większość z tych enzymów w niewielkim stopniu rozróżnia nasycone kwasy tłuszczowe pod względem długości ich łańcucha węglowego. Hydroлизują one lub estryfikują, ze zbliżoną szybkością, nasycone kwasy tłuszczowe o długości łańcucha węglowego zawartego pomiędzy C<sub>2</sub> a C<sub>18</sub>.

Znacznie wyższą specyficzność wykazują lipazy wobec nienasyconych kwasów tłuszczowych (tab. 5). Lipaza GCL na przykład, preferuje hydrolizę acylogliceroli zawierających kwasy tłuszczowe z podwójnym wiązaniem *cis*Δ<sub>9</sub>. Odszczepia kwas oleinowy 100 razy szybciej niż kwas stearynowy (36-38). Lipaza ta została zastosowana przez firmę Nippon Oils & Fats do otrzymywania superczystych nienasyconych kwasów tłuszczowych (4). Z kolei lipaza CRL wyróżnia kwasy erukowy (*cis*Δ<sub>13</sub>, C<sub>22</sub>) i kwas γ-linolowy (*cis*Δ<sub>9</sub>, *cis*Δ<sub>12</sub>, C<sub>18</sub>) (39,40). Wykorzystując tę specyficzność lipaz można przeprowadzić modyfikację tłuszczów polegającą na wprowadzeniu polienasyconych kwasów tłuszczowych do triacylogliceroli zawierających kwasy nasycone (41-44).

Ilościowy pomiar selektywności lipaz w środowisku wodnym jest utrudniony z powodu ułatwionej migracji reszty acylowej acyloglicerolu. Badania te należy prowadzić w środowisku rozpuszczalników apolarnych, w których migracja acylu zachodzi bardzo wolno. Ponieważ większość prac dotycząca regioselektywności lipaz

została wykonana w środowisku wodnym zdarza się, że w doniesieniach literaturo-  
wych podaje się sprzeczne informacje (4).

Tabela 5

## Przykłady selektywności lipaz względem kwasów tłuszczowych (cyt. za 4)

Lipaza – symbol	Selektywność	Literatura
CAL-B, CRL, HLL, PCL, PPL, RML	niewielka	(45-47)
ProgL	S, M >> L <sup>a</sup>	(47)
ROL	M, L <sup>a</sup>	(47)
GCL	preferuje kwas erukowy ( <i>cisD13C22</i> )	(48)
RML	odróżnia polinienasycone kwasy tłuszczowe	(49,50)
Lipaza z <i>Brassica napus</i>	odróżnia kwasy tłuszczowe zawierające wiązania <i>cis</i> Δ4 lub <i>cis</i> Δ6	(51)
GCL	selektywna wobec podwójnych wiązań <i>cis</i> Δ9	(52-54)

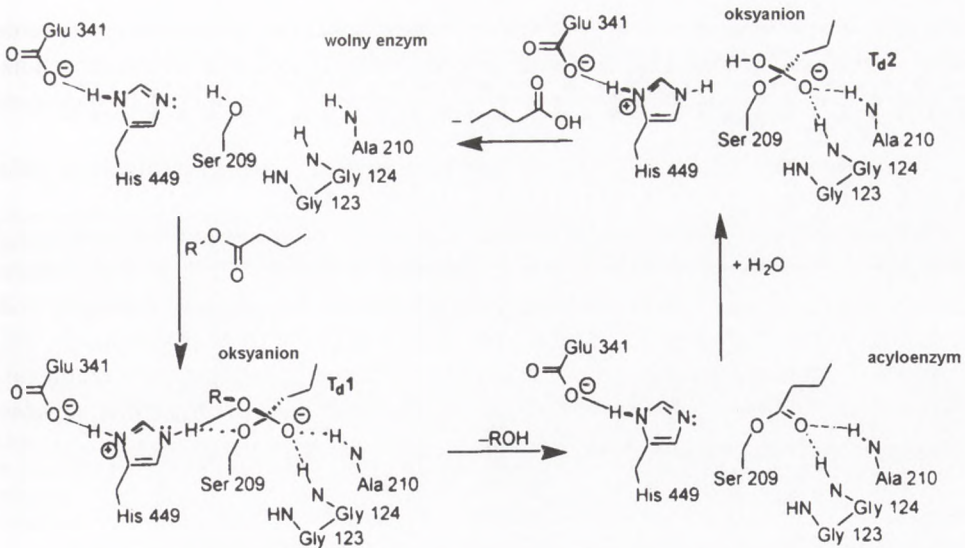
<sup>a</sup> S, M, L - w kolejności: krótko-, średnio- i długołańcuchowe kwasy tłuszczowe

## 5.2. Specyficzność w środowisku niewodnym

Stwierdzono eksperymentalnie, że selektywność enzymów w rozpuszczalnikach organicznych jest inna aniżeli w wodzie, oraz może być regulowana przez zmianę rozpuszczalnika (lub mieszaniny rozpuszczalników). W środowisku niewodnym lipazy wykazują stereo- i enancjospecyficzność w stosunku do estrów, peptydów, amidów i estrów tiolowych (24,55-63). Możliwość kontrolowania kierunku reakcji katalizowanych przez enzymy oraz ich specyficzności w środowisku niewodnym spowodowała rozwój tzw. „inżynierii rozpuszczalnikowej” (nazywanej też szerzej „inżynierią środowiska reakcji”, *medium engineering*), która dostarcza alternatywnych rozwiązań dla inżynierii białkowej (64). Wyraża się ona w poszukiwaniu nowych zastosowań handlowych preparatów enzymów w środowiskach niekonwencjonalnych. Jej zaletą jest niski koszt i prostota wykonania, wadą zaś niewielki (jak dotąd) poziom wiedzy teoretycznej.

## 6. Mechanizm hydrolizy estrów

Orientacja przestrzenna centrum aktywnego lipaz jest w przybliżeniu lustrzanym odbiciem centrum aktywnego subtylizyny i chymotrypsyny. Fakt, że centrum aktywne lipaz ma taki sam charakter jak u proteinaz serynowych (65) sugeruje podobny mechanizm katalizy z udziałem tych enzymów. Mechanizm ten pokazano na przykładzie hydrolizy estrów kwasu masłowego na rysunku 1 (cyt. za 4).



Rys. 1. Schemat hydrolizy estrów kwasu masłowego katalizowanej przez lipazy, uwzględniający tworzenie się acylowej pochodnej enzymu oraz dwóch różnych, tetraedrycznych struktur przejściowych (numeracja aminokwasów odpowiada centrum aktywnemu lipazy *Candida rugosa* – CRL). T<sub>d1</sub> – oznacza pierwszą tetraedryczną strukturę przejściową związaną z tworzeniem pochodnej acylowej enzymu. Uwalniany jest alkohol. Ten etap warunkuje selektywność lipaz w stosunku do alkoholi. T<sub>d2</sub> – oznacza drugą tetraedryczną strukturę przejściową, której powstanie związane jest z uwalnianiem acylu. Ten etap determinuje selektywność lipaz w stosunku do kwasów.

Jääskeläinen i in. (66) zastosowali symulacje dynamiki molekularnej oraz kalkulewali wielkości potencjałów elektrostatycznych kompleksu lipazy *Rhizomucor miehei* z substratami. Stwierdzili, że katalitycznie ważne wiązania wodorowe są tworzone łatwiej, kiedy kwas jest zlokalizowany w hydrofobowym, a ester w hydrofilowym regionie centrum aktywnego. Postawiono hipotezę, że różnice między wartościami potencjałów elektrostatycznych na powierzchni cząsteczki lipazy mogą pomagać w odpowiedniej orientacji tego białka w przestrzeni międzyfazowej. Petersen i in. (67) wykazali, że rozkład elektrostatycznego potencjału na powierzchni molekuly lipazy (będący funkcją pH) oddziałuje w dużym zakresie na profil pH aktywności enzymów.

## 7. Środowisko reakcji katalizowanych przez lipazy

Środowisko reakcji oddziałuje w sposób szczególny na katalityczne właściwości lipaz (31-34). Na przebieg reakcji *in vitro* wpływają następujące czynniki (35):

- biologiczne: źródło lipaz,



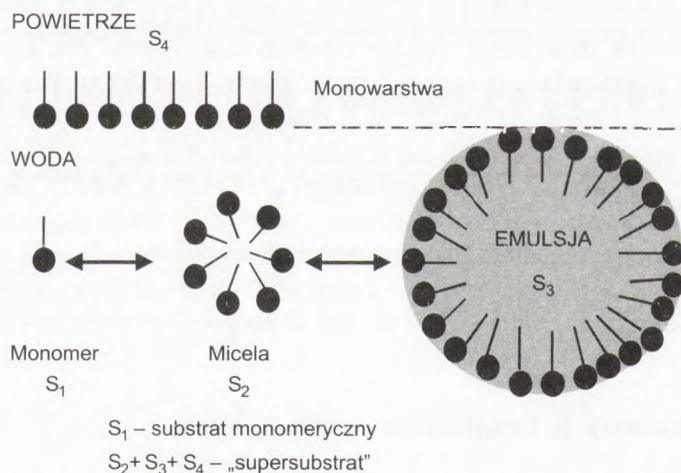
– chemiczne: specyficzność lipaz, skład i właściwości fazy organicznej, stężenie wody, rodzaj substratów i ich stężenia molowe, rodzaj i stężenia ewentualnych aktywatorów reakcji (np. surfaktantów), pH warstwy wody niezbędnej (wyjaśnienie pojęcia w rozdz. 7.2.),

– fizyczne: czas trwania reakcji, temperatura, wymiana masy i ciśnienie w układzie reakcyjnym.

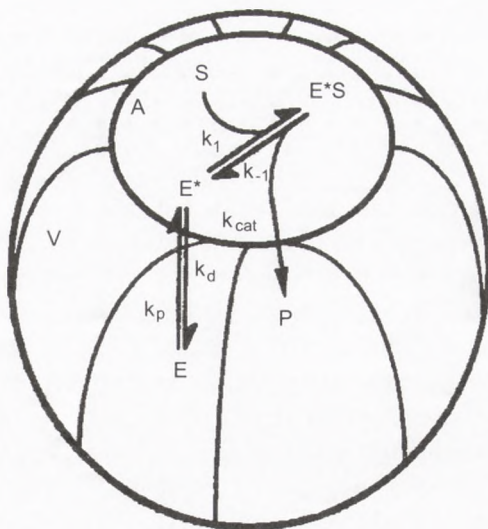
Przy wysokim stężeniu wody w środowisku reakcji preferowana jest reakcja hydrolizy, podczas gdy jej niskie stężenie sprzyja reakcji syntezy. Reakcja ta jest odwracalna, ponieważ różnica energii swobodnej związana ze zmianą kierunku reakcji hydroliza-synteza jest dla lipaz niewielka i wynosi ok.  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  (68). Dlatego zmieniając środowisko z wodnego na niewodne można tak pokierować reakcją, by przebiegała ona w kierunku syntezy: grupy acylowe z cząsteczki donora przenoszone są wówczas na akceptory inne niż woda (69,70).

## 7.1. Woda

Woda jest naturalnym środowiskiem działania lipaz. Hydrofobowy charakter substratów (np. triacylogliceroli) powoduje, że lipazy działają na granicy faz (rys. 2), a ich aktywność zależy w dużej mierze od wielkości powierzchni substratu dostępnej dla enzymu (71). Dlatego w celu efektywnej hydrolizy triacylogliceroli w środowisku wodnym są one przed reakcją emulgowane. W środowisku rozpuszczalników apolarnych, w których hydrofobowe substraty są rozpuszczalne, szybkość hydrolizy acylogliceroli jest wypadkową aktywności lipazy oraz stężenia wody w środowisku reakcji.



Rys. 2. Schemat rozmieszczenia molekuł estrów w środowisku wodnym. Monomer ( $S_1$ ), micela ( $S_2$ ), emulsja ( $S_3$ ), i zaadsorbowana monowarstwa estru na powierzchni wody ( $S_4$ ) współistnieją w stanie równowagi i reprezentują dla lipazy potencjalne substraty: „monomeryczny substrat” ( $S_1$ ) lub „supersubstrat” ( $S_2 + S_3 + S_4$ ).



Rys. 3. Model międzyfazowej reakcji: lipaza rozpuszczona w wodzie – nierozpuszczalny substrat (cyt. za 72). A – powierzchnia, V – objętość, E – enzym, E\* – enzym w formie aktywnej (rozdz. 7.1.1.), S – substrat, E\*S – kompleks enzym-substrat, P – produkt,  $k_1$  – stała kinetyczna wiązania substratu z enzymem,  $k_{-1}$  – stała kinetyczna dysocjacji substratu z kompleksu,  $k_p$  – stała kinetyczna adsorbacji enzymu na powierzchni interfazy,  $k_d$  – stała kinetyczna desorbacji enzymu z interfazy,  $k_{cat}$  – stała kinetyczna katalizy.

Model opisujący międzyfazową reakcję pomiędzy rozpuszczalną w wodzie lipazą a kroplą nierozpuszczalnego substratu zamieszczono na rysunku 3.

Aktywność lipaz w środowisku wodnym zależy od ich źródła oraz temperatury i pH środowiska. Zależy ona także od wrażliwości enzymu na aktywację lub inhibicję przez takie czynniki jak jony metali, surfaktanty i inne (73-75).

Substancje powierzchniowo czynne odgrywają ważną rolę w aktywności lipaz. Emulgatory poza funkcją rozwinięcia powierzchni substratu dostępnej dla enzymu bezpośrednio oddziałują na aktywność lipaz (76-78). Surfaktanty dodane do środowiska emulsji substratu w zależności od ich stężenia mogą być aktywatorami lub inhibitorami procesu katalitycznego.

### 7.1.1. Molekularne podstawy aktywacji międzyfazowej

Cechą charakterystyczną lipaz, wyróżniającą je spośród innych enzymów jest właściwość międzyfazowej aktywacji w obecności apolarnego substratu zawieszonoego w środowisku wodnym.

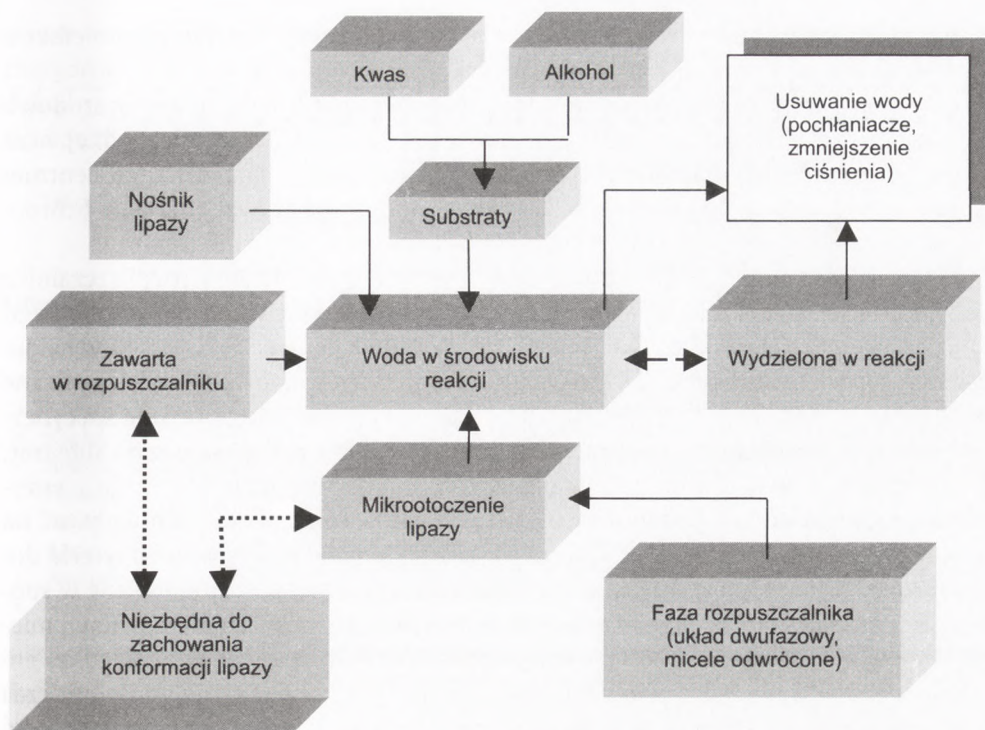
Molekularne podstawy tego zjawiska są dyskutowane od dawna. Brockerhoff (71) zaproponował tzw. teorię substratową, w której uwydatnia się rolę takich czynników jak stężenie i formę substratu w przestrzeni międzyfazowej lipid-woda. Desnuelle i in. (79) postulowali zmiany konformacyjne w białku lipazy po jego *adsorbacji* w interfazie. Rozwiązanie pierwszej krystalograficznej struktury lipazy dostarczyło dowodów potwierdzających wcześniejsze teorie, okazało się bowiem, że centrum aktywne enzymu jest niedostępne dla rozpuszczalnika, jeżeli znajduje się on w śro-

dowisku wodnym. Opisane w literaturze, wykonane z wysoką rozdzielczością struktury kolejnych lipaz pokazują, że z wyjątkiem kutynazy (*cutinase*) (80,81) i acetylocholinoesterazy (4) enzymy te zawierają zlokalizowaną nad centrum aktywnym amfipatyczną domenę polipeptydową o helikalnej strukturze, nazwaną także „wieczkiem” (*lid* lub *flap*). Grochulski i in. (82) stwierdzili, że lipaza *C. rugosa* w środowisku o niskiej sile jonowej krystalizuje w konformacji zawierającej otwarte „wieczko”. Lipazy wykazują niewielką aktywność w stosunku do rozpuszczalnych w wodzie substratów, ponieważ „wieczko” zakrywa centrum katalityczne. Zetknięcie nierozpuszczalnego substratu z białkiem lipazy generuje w tym białku zmiany konformacyjne, w wyniku których „wieczko” odkrywa centrum katalityczne i aktywność enzymu wzrasta. Nowo powstała konformacja lipazy jest prawdopodobnie stabilizowana przez elementy strukturalne obecne w molekułe enzymu (4,83-89). Uważa się, że mechanizm aktywacji międzyfazowej lipaz może się okazać bardziej skomplikowany, ponieważ np. lipazy z *Pseudomonas aeruginosa* (CVL i CAL-B) nie wykazują aktywacji międzyfazowej, a posiadają „wieczko”. Natomiast lipaza ze *Staphylococcus hyicus* podlega zjawisku aktywacji międzyfazowej jedynie w obecności niektórych substratów. Podobnie, w grupie enzymów trzustkowych znaleziono nową tzw. *coypu* lipazę, która posiada „wieczko” złożone z 23 aminokwasów, homologiczne w stosunku do „klasycznej” lipazy trzustkowej, lecz enzym ten nie ulega aktywacji międzyfazowej (4,71).

## 7.2. Rozpuszczalniki organiczne

Rozpuszczalniki organiczne, powszechnie znane jako substancje denaturujące białka, mogą stanowić środowisko reakcji dla wielu przemian enzymatycznych *in vitro* (32,33,46,90-99). Dotyczy to zwłaszcza tych reakcji, w 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.

Woda podczas przemian katalizowanych przez lipazy w środowisku niewodnym stanowi zarówno element środowiska, jak i jeden z produktów reakcji, a jej znaczenie w katalizie należy uznać za podstawowe. W środowisku rozpuszczalników organicznych obecność wody nie tylko wpływa na wartość stałej równowagi reakcji, lecz przede wszystkim jej cząsteczki, wysycając hydrofilowe regiony, utrzymują katalityczną konformację enzymu w środowisku hydrofobowym. Tworzy ona bardzo cienką warstwę zewnętrzną, która stabilizuje katalityczną konformację enzymu i dlatego nazywa się ją warstwą wody niezbędnej lub wodą niezbędną (30,31,33,100, 101). Schemat lokalizacji wody w środowisku reakcji syntezy estrów zamieszczono na rysunku 4 (31).



Rys. 4. Lokalizacja wody w organicznym środowisku reakcji. Linie kropkowane oznaczają szczególnie rodzaj oddziaływań woda-rozpuszczalnik-lipaza decydujących o aktywnej konformacji enzymu.

Stwierdzono, że lipazy i inne enzymy mogą być stabilne w środowisku apolarnych rozpuszczalników w warunkach ekstremalnych, tj. w temperaturze 100-140°C (35,102-104). Mechanizm stabilizacji białek w podwyższonej temperaturze nie jest do końca wiadomy. Znaczące udziały energii stabilizacji pochodzą z oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy polarnymi i zjonizowanymi grupami (wiązania wodorowe, oddziaływania pomiędzy dipolami i pary jonowe) oraz efektów hydrofobowych, w których biorą udział reszty niepolarne. Fizyczna natura tych ostatnich jest obecnie rozważana jako pochodząca z entropii i entalpii, dlatego że stwierdzono w oddziaływaniach hydrofobowych znaczny udział sił van der Waalsa. Oszacowanie wpływu temperatury, ciśnienia, ładunku, aktywności wodnej na swobodną energię stabilizacji białek pozostaje do dziś problemem nie rozwiązany (105).

Generalnie, apolarne rozpuszczalniki organiczne, z racji swoich właściwości (brak zdolności tworzenia wielokrotnych wiązań wodorowych), generują zmiany konformacyjne, które powodują silniejsze oddziaływania elektrostatyczne wewnątrz molekuły białka, czego efektem jest usztywnienie jego struktury. Ogranicza to możli-

wość zmian konformacyjnych enzymu w trakcie katalizy, co w ostatecznym efekcie przekłada się na obniżenie jego aktywności.

Elementami sprzyjającymi zachowaniu aktywnej konformacji lipazy w środowisku apolarnym jest usztywniające oddziaływanie warstwy wody niezbędnej oraz sama budowa centrum aktywnego enzymu. Hydrofobowy charakter tego centrum sprawia, że substancje o podobnym charakterze mogą wykazywać działanie ochronne względem tego rejonu białka lipazy (4,64).

Dotychczas nie wiadomo, co decyduje o przydatności danego rozpuszczalnika jako środowiska biokatalizy. Wewnętrzne upakowanie łańcucha polipeptydowego oraz zewnętrzne jego oddziaływania z rozpuszczalnikami jest zazwyczaj indywidualnie optymalizowane przez białko (105). Wiadomo, że rozpuszczalniki organiczne mogą w różnorodny sposób oddziaływać z molekułą białka. Mogą się one specyficznie wiązać z enzymem nie dopuszczając do utworzenia kompleksu enzym-substrat, mogą zmieniać stan równowagi katalizowanej reakcji, wchodzić w reakcję z enzymem, stabilizować lub destabilizować enzym oraz w rozmaity sposób wpływać na szybkość katalizowanej reakcji. Obecnie znane są jedynie podstawowe kryteria doboru rozpuszczalnika organicznego w reakcji syntezy estrów, sformułowane w sposób raczej dogmatyczny przez Laane i in. (106,107): „Rozpuszczalnik powinien mieszać się w sposób ograniczony z wodą oraz zakłócać warstwę wody niezbędnej enzymu w stopniu możliwie najmniejszym”. Bardzo przydatne, szczególnie podczas systematyzacji wyników, jest kryterium *polarności medium*, liczone jako suma stałych hydrofobowych poszczególnych atomów (106,107), wyrażone jako  $\log P$ . Jeżeli siła wiązania warstwy wody niezbędnej z lipazą jest duża, to enzym może wykazywać zdolność do syntezy estrów także w rozpuszczalnikach mieszających się z wodą (108). Siła wiązania, rejon występowania i grubość warstwy wody niezbędnej jest cechą indywidualną enzymu uzależnioną od jego chemicznej budowy i struktury przestrzennej oraz usytuowania w strefie powierzchniowej białka grup funkcyjnych (108). Ponieważ dotychczas poznano strukturę przestrzenną jedynie kilku lipaz, jest oczywiste, że w zasadzie wyboru najlepszego rozpuszczalnika można dokonać jedynie empirycznie.

## 8. Zakończenie

Właściwości lipaz, które powodują tak duże i ciągle wzrastające nimi zainteresowanie, to nie tylko zdolność hydrolizy tłuszczów w środowisku wodnym, lecz także unikatowe „uzdolnienia” tych enzymów w środowisku niewodnym, które spowodowały rozwój nowej gałęzi biotechnologii nazywanej „biokatalizą w niekonwencjonalnych mediach” (109) lub enzymologią niewodną (62). Ogromny postęp jaki nastąpił w ciągu ostatnich lat w tej dziedzinie sprawił, że lipazy znalazły wiele praktycznych zastosowań. Wszędzie tam gdzie występuje potrzeba hydrolizy tłuszczów jadalnych, usuwania zabrudzeń tłuszczowych, modyfikacji składu tłuszczów, otrzy-

mywania „zielonych” bioemulgatorów (np. mono- i diacylogliceroli lub estrów sacharydów), produkcji kosmetyków i środków zapachowych, produkcji leków, produkcji smarów i składników paliw oraz produkcji poliestrów coraz częściej stosuje się lipazy.

Praca finansowana była z grantu Komitetu Badań Naukowych PBZ KBN nr 021/PO6/99/22.

## Literatura

1. Webb E. C., (1992), *In Enzyme Nomenclature*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 306-449.
2. Adamczak M., Bednarski W., (1994), *Biotechnologia*, 27, 140-153.
3. Ghandi N. N., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 621-634.
4. Kazlauskas R. J., Bornscheuer U. T., (1998), *Biotransformations with lipases*, *Biotechnology* 2<sup>nd</sup> ed., 8<sup>a</sup>, *Biotransformation* I, Ed. Kelly D. R., Wiley-VCH, Weinheim, 37-191.
5. Haliniarz E., Lejczak B., (1996), *Wiadomości Chemiczne*, 50, 193-211.
6. Cardenas F., de Castro M. S., Sanchez-Montero J. M., Sinisterra J. V., Valmaseda M., Elson S. W., Alvarez E., (2001), *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 145-154.
7. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 38, 95-110.
8. Maliszewska I., Mastalerz P., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 190-193.
9. Salleh A. B., Musani R., Basri M., Ampon K., Yunas W. M. Z., Razak C. N. A., (1993), *Can. J. Microbiol.*, 39, 978-981.
10. Lotrakul P., Dharmstithi S., (1997), *J. Biotechnol.*, 54, 113-120.
11. Berto P., Belingheri L., Dehorter B., (1997), *Biotechnol Lett.*, 19, 533-536.
12. Rapp P., Backhaus S., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 938-943.
13. Rúa M. L., Schmid-Dannert C., Wahl S., Sprauer A., Schmid R. D., (1997), *J. Biotechnol.*, 56, 89-102.
14. Adamczak M., (2000), *Fourteenth Forum for Applied Biotechnology*, Proceedings, I, Landbouww. Univ. Gent, 65(3a), 327-330.
15. Hiol A., Jonzo M. D., Druet D., Comeau L., (1999), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 25, 80-87.
16. Adamczak M., Bednarski W., (2000), *Fourteenth Forum for Applied Biotechnology*, Proceedings, I, Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 65(3a), 323-326.
17. Ganet C., (1990), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 613, 600-604.
18. Essamri M., Deyris V., Comeau L., (1998), *J. Biotechnol.*, 60, 97-103.
19. Schuepp C., Kermasha S., Michalski M. C., Morin A., (1997), *Process Biochemistry*, 32, 225-232.
20. Long K., Ghazali H. M., Ariff A., Man Y. C., Bucke Ch., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 369-372.
21. Long K., Ghazali H. M., Ariff A., Bucke Ch., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1121-1128.
22. Dalmau E., Montesinos J. L., Lotti M., Casas C., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 657-663.
23. Long K., Ghazali H. M., Ariff A., Ampon K., Bucke C., (1996), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 67, 157-163.
24. Jaeger K-E., Reetz M. T., (1998), *TIBTECH*, 16, 396-403.
25. Verrips T., Duboc P., Visser Ch., Sagt C., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 812-818.
26. Antczak T., (2001), *Lipazy grzybowe *Mucor circinelloides* i *Mucor racemosus*: otrzymywanie i katalityczne właściwości*, *Zeszyty Naukowe PŁ*, 884, Seria: Rozprawy Naukowe, 298, 1-175.
27. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1995), *Biotechnologia*, 29, 82-91.
28. Cygler M., Schirag J. D., Sussman J. L., Harel M., Silman I., (1993), *Protein Sci.*, 2, 366-382.
29. Svendsen A., (1994), *Sequence comparisons within the lipase family*, in: *Lipases, their structure, biochemistry and applications*, Eds. Woolley P., Petersen S. B., 1-21, Cambridge, U.K., Cambridge University Press.
30. Derewenda Z. S., Derewenda U., Dodson G. G., (1992), *J. Mol. Biol.*, 227, 818-839.
31. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 11, 62-70.

32. Halling P. J., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 178-206.
33. Wescott C. R., Klibanov A. M., (1994), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1206, 1-9.
34. Valivety R. H., Johnston G. A., Suckling C. J., Halling P. J., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1137-1143.
35. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 20, 59-67.
36. Jensen R. G., (1974), *Lipids*, 9, 149-157.
37. Baillargeon M. W., McCarthy S. G., (1991), *Lipids*, 26, 831-836.
38. Charton E., Macrae A. R., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 489-493.
39. Ergan F., Trani M., Andre G., (1991), *Inform.*, 2, 357.
40. Trani M., Lortie R., Ergan F., (1992), *Inform.*, 3, 482.
41. Gill I., Valivety R., (1997), *TIBTECH*, 15, 470-478.
42. McNeill G. P., Ackman R. G., Moore S. R., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1403-1407.
43. Moore S. R., McNeill G. P., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1409-1414.
44. Mukherjee K. D., Kiewitt I., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 613-616.
45. Rangheard M. S., Langrand G., Triantaphylides C., Baratti J., (1989), *Biochim. Biophys. Acta*, 1004, 20-28.
46. Berger M., Schneider M. P., (1991), *Biotechnol Lett.*, 13, 641-645.
47. *Materiały informacyjne*, (1996), Amano Enzyme Company.
48. Sonnet P. E., Foglia T. A., Fearheller S. H., (1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 387-391.
49. Pedersen S. B., Holmer G., (1995), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 239-243.
50. Kosungi Y., Chang Q-L., Kanazawa K., Nakanishi H., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1395-1399.
51. Hills M. J., Kiewitt I., Mukherjee K. D., (1990), *Biochim. Biophys. Acta*, 1041, 237-240.
52. Jensen R. G., (1974), *Lipids*, 9, 149-157.
53. Baillargeon M. W., McCarthy S. G., (1991), *Lipids*, 26, 831-836.
54. Charton E., Macrae A. R., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 489-493.
55. van Tol J. B. A., Jongejan J. A., Dune J. A., (1995), *Biocatal. Biotransfor.*, 12, 99-117.
56. Basavaiah D., Krishna P. R., (1994), *Tetrahedron*, 50, 10521-10530.
57. Wang Y. F., Wong C. H., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 3127-3129.
58. Turner N. J., Winterman J. R., McCague R. Paitat J. S., Taylor S. J. C., (1995), *Tetrahedron Lett.*, 3, 1113-1116.
59. Balkenhohl F., Ditrich K., Hauer B., Ladner W., (1997), *J. Prakt. Chem.*, 339, 381-384.
60. Haliniarz E., Lejczak B., (1996), *Wiadomości Chemiczne*, 50, 193-211.
61. Chen C-S., Sih Ch. J., (1989), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 695-707.
62. Öhrner N., Martinelle M., Matison A., Norin T., Hult K., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 328-331.
63. Kiefer M., Vogel R., Helmchen G., Nuber B., (1994), *Tetrahedron*, 50, 7109-7114.
64. Klibanov A. M., (1997), *TIBTECH*, 15, 97-101.
65. Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dodson E., Dodson G., et al., (1990), *Nature*, 343, 767-770.
66. Jääskeläinen S., Linko S., Raaska T., Laaksonen L., Linko Y-Y., (1997), *Biotechnology*, 52, 267-275.
67. Petersen M. T. N., Fojan P., Petersen S. B., (2001), *J. Biotechn.*, 85, 115-147.
68. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513-516.
69. Khmel'nitsky Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. Y., Martinek K., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 709-724.
70. Bloomer S., Adlercreutz P., Mattisson B., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 966-973.
71. Verger R., (1997), *TIBTECH*, 15, 32-38.
72. Paiva A. L., Balcão V. M., Malcata F. X., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 187-204.
73. Sharon C., Furugoh S., Yamakido T., Ogawa H., Kato Y., (1998), *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, 20, 304-307.
74. Ogiso T., Sugiura M., (1969), *Chem. Pharm., Bull.*, 17, 1025-1033.
75. Kolossváry G. J., (1996), *Process Biochemistry*, 31, 595-600.
76. Sugiura M., Isobe M., (1975), *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1221-1225.
77. Entressangles B., Desnuelle P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 285-295.

78. Kierkels J. G. T., Vleugels L. F. W., Kern J. H. A., Meijer E. M., Kloosterman M., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 760-763.
79. Desnuelle P., Sarda L., Aihaud G., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, 37, 570-571.
80. Martinez C., de Geus P., Lauwereys M., Mathysens G., Cambillau C., (1992), *Nature*, 356, 615-618.
81. Gonçaves A. M., Schacht E., Matthijs G., Aires Barros M. R., Cabral J. M. S., Gil M. H., (1999), *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 60-66.
82. Grochulski P., Yunge L., Schrag J. D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M., (1993), *J. Mol. Chem.*, 268, 12843-12847.
83. van Tilbeurk H., Serda L., Verger R., Cambillau C., (1992), *Nature*, 359, 159-162.
84. van Tilbeurk H., Egloff M. P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C., (1993), *Nature*, 362, 814-820.
85. Winkler F. K., D'Arcy A., Hunziker W., (1990), *Nature*, 343, 771-774.
86. Derewenda Z. S., (1994), *Adv. Protein Chem.*, 45, 1-52.
87. Linko Y.-Y., Seppälä J., (1996), *CHEMITECH*, 26, 25-31.
88. Norin M., Olsen O., Svendsen A., Edholm O., Hult K., (1993), *Protein Eng.*, 6, 855-863.
89. Derewenda U., Swenson L., Green R., Wei Y., Yamaguchi S., Joerger R., Haas M. J., Derewenda Z. S., (1994), *Protein Eng.*, 7, 551-557.
90. Leon R., Fernandes P., Pinheiro H. M., Cabral J. M. S., (1998), *Enz. Microb. Technol.*, 23, 483-500.
91. Yahya A. R. M., Anderson W. A., Moo-Young M., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 438-450.
92. Tramper J., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 52, 290-295.
93. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201.
94. Zaks A., Klibanov A. M., (1985), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 3192-3196.
95. Bell G., Halling P. J., Moore B. D., Partidge J., Rees D. G., (1995), *TIBTECH*, 13, 468-473.
96. Borzeix F., Monot F., Vandecasteele J. P., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 791-797.
97. Kuo S.-J., Parkin K. L., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1427-1433.
98. Klibanov A. M., (1986), *Chemitech.*, 16, 345-359.
99. Dordick J. S., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 194-211.
100. Broos J., Visser A. J. W. G., Engbersen J. F. J., Verboom W., van Hoek A., Reinhold D. N., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12657-12663.
101. Vassel B., Hecht H.-J., Schmid R. D., Schomburg D., (1993), *J. Biotechnol.*, 28, 99-115.
102. Antczak T., Morowiec-Białoń J., Bielecki S., Jarzębski A. B., Malinowski J. J., Lachowski A. I., Galas E., (1997), *Biotechn. Technol.*, 11, 9-11.
103. Zaks A., Klibanov A. M., (1984), *Science*, 22, 1249-1251.
104. Volkin D. B., Staubli A., Langer R., Klibanov A. M., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 843-853.
105. Jaenicke R., (2000), *J. Biotechnol.*, 79, 193-203.
106. Laane C., Boeren S., Hilhorst R., Veeger C., (1987), *Optimization of biocatalysts in organic media*, in: *Biocatalysis in organic media*, Eds. Laane C., Tramper J., Lilly M. D., Elsevier, Amsterdam, 65-84.
107. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
108. Zaks A., (1991), *Enzymes in organic solvents*, in: *Biocatalysts for industry*, Ed. Dordick J. S., Plenum Press, New York and London, 161-180.
109. Adlercreutz P., (1994), *Biocatalysis in non-conventional media*, in: *Applied Biocatalysis*, Cabral, Best, Boross, Ed. Tramper J., Harwood Academic Publishers, 279-298.