



Kierunki i perspektywy zastosowania lipaz

Maciej Pilarek, Krzysztof W. Szewczyk, Michał Wrona
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska,
Warszawa

Trends and perspectives of lipases applications

Summary

Properties of microbial lipases important in practical applications are briefly described. Applications of lipases in wide branches of industry are presented. Potential fields of lipases applications are also discussed.

Key words:

lipases, industrial applications, alcoholysis, hydrolysis.

1. Wprowadzenie

Lipazy (acylohydrolazy triacylogliceroli; EC 3.1.1.3) są enzymami powszechnie występującymi w przyrodzie. W organizmach zwierząt różnorodne lipazy uczestniczą w procesach trawienia, wchłaniania i wydalania tłuszczów, jak również w metabolizmie lipoprotein. Lipazy roślinne występują w dużych ilościach w tkankach stanowiących rezerwy energetyczne roślin. Również liczne gatunki bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych wytwarzają te enzymy.

Lipazy w środowisku wodnym katalizują hydrolizę triacylogliceroli do kwasów tłuszczowych, di- i monoacylogliceroli oraz glicerolu. Istnieje wiele zastosowań procesu hydrolizy tłuszczów w przemyśle: wytwarzanie kwasów tłuszczowych z olejów naturalnych; usuwanie tłuszczów i olejów z tkanin (włókien), skór i ścieków; produkcja mono- i diglicerydów oraz modyfikacja surowców w przemyśle spożywczym.

Adres do korespondencji

Maciej Pilarek,
Wydział Inżynierii
Chemicznej i Procesowej,
Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1,
00-645 Warszawa;
e-mail:
pilarek@ichip.pw.edu.pl

biotechnologia

2 (57) 146-164 2002

W ciągu ostatnich kilkunastu lat, obok zastosowania lipaz w środowiskach wodnych z udziałem nierozpuszczalnych substratów, coraz więcej zastosowań dotyczy przetwarzania szerokiej gamy nierozpuszczalnych substratów w systemach bezwodnych z udziałem immobilizowanych enzymów. Fakt, że lipazy pozostają aktywne w rozpuszczalnikach organicznych znacznie poszerzył możliwości wykorzystania tych enzymów w przemyśle chemicznym. W warunkach prawie bezwodnych lipazy mogą katalizować różnorodne reakcje, takie jak syntezę estrów, transestryfikację, regioselektywną acylację, a nawet syntezę peptydów. Wysoka stereoselektywność lipaz jest wykorzystywana do syntezy związków enancjomerycznie czystych.

W artykule przedstawiono główne obszary zastosowania lipaz oraz przedyskutowano możliwe kierunki rozwoju aplikacji tych enzymów.

2. Występowanie i ogólna charakterystyka lipaz

Lipazy są klasyfikowane jako hydrolazy serynowe, które nie potrzebują kofaktora. Enzymy te należą do glikoprotein i zawierają od 2 do 15% cukrowców (1). Hydrolazy triacyloglicerolowe są grupą enzymów lipolitycznych katalizujących rozpad wiązań estrowych wchodzących w skład cząsteczek lipidów: tri-, di-, i monoacylogliceroli, które są ich naturalnymi substratami. Przedstawiana grupa enzymów wykorzystuje jako substraty także inne nierozpuszczalne w wodzie, nisko- i wysokocząsteczkowe związki organiczne, takie jak estry, poliestry czy woski.

Lipazy są enzymami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym i zwierzęcym ze względu na ich podstawowe znaczenie we wszystkich etapach metabolizmu tłuszczowców. U zwierząt wyższych różne specyficzne lipazy kontrolują procesy trawienia tłuszczów. U roślin występują szczególnie obficie w tkankach przechowujących materiały zapasowe, przede wszystkim w nasionach.

Wiele koncernów biotechnologicznych i chemicznych oferuje cały szereg oczyszczonych lipaz pochodzenia mikrobiologicznego, zarówno w postaci liofilizatu, jak i enzymów unieruchomionych na rozmaitych nośnikach. Bogata oferta handlowa w tej dziedzinie stwarza możliwość bardzo dokładnego wyboru preparatu w zależności od założeń projektowych określonego procesu doświadczalnego lub produkcyjnego. W tabeli 1 zestawiono najczęściej stosowane lipazy.

W zależności od preferencji substratowych enzymu wyróżnić można kilka rodzajów selektywności lipaz.

Przykłady komercyjnie dostępnych lipaz pochodzenia mikrobiologicznego (2)

Pochodzenie enzymu	Mikroorganizm – źródło enzymu	Oferta handlowa
grzybowe	<i>Candida rugosa</i> (<i>C. cylindracea</i>)	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica</i>	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Humicola lanuginosa</i> (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>Rhizomucor miebei</i>	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
bakteryjne	<i>Pseudomonas cepacia</i> (<i>Burkholderia cepacia</i>)	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Ashai, Biocatalysts

2.1. Specyficzność względem rodzaju substratu

Wiele lipaz z różną szybkością katalizuje reakcje, w których substratami są mono-, di- lub triacyloglicerole. Na przykład lipaza z *Penicillium cyclopium* hydrolizuje głównie mono- i diacyloglicerole zaś reakcja z udziałem triacylogliceroli przebiega bardzo powoli (3).

2.2. Specyficzność względem położenia reszty kwasowej w triacyloglicerolach

W zależności od pozycji reszty kwasowej w cząsteczce acyloglicerolu, lipazy podzielić można na dwie grupy: selektywne względem pozycji 1,3- (lipazy sn 1,3- selektywne) oraz nieselektywne. Większości lipaz pochodzenia mikrobiologicznego przypisuje się selektywność względem podstawienia grup hydroksylowych resztami kwasów tłuszczowych. Jednak specyficzność tę traktuje się jako zmienną: od absolutnej, poprzez słabą, aż do zupełnego braku selektywności w wyborze wiązania estrowego w zależności od konkretnego substratu (4). Określenie selektywności komplikuje ponadto występowanie nieenzymatycznej migracji grupy acylowej z pozycji sn 2 na pozycję sn 1.

W przemyśle tłuszczowym i olejowym specyficzność pozycyjna jest ważna ze względu na możliwość otrzymywania pożądaných produktów hydrolizy bądź estryfikacji. Dla przykładu można otrzymać 2-acyloglicerole, lub 2,3-diacyloglicerole w obecności sn 1,3-selektywnej lipazy. Przy użyciu sn 1,3-selektywnej lipazy można wprowadzić pożądanę kwasową resztę w te pozycje, pozostawiając nienaruszoną resztę kwasową w pozycji sn 2. Używając lipaz niespecyficznych w transestryfikacji, można uzyskać mieszaniny estrów o składzie podobnym do tych uzyskiwanych metodami chemicznymi.

2.3. Regioselektywność lipaz

Lipazy posiadają także zdolność katalizowania reakcji acylacji i deacylacji jednej z grup hydroksylowych całego szeregu substratów organicznych takich jak: węglowodany i ich pochodne, alkohole i alkaloidy wielohydroksylowe oraz niektóre steroidy. Lipazy wykazują w przypadku tych związków wysoką regioselektywność, tzn. katalizują przemianę grup położonych tylko w ściśle określonym obszarze cząsteczki. Dobrymi przykładami mogą być preparaty enzymatyczne uzyskane z *Candida antarctica* oraz z *Pseudomonas fluorescens*. Pierwszy z tych enzymów odznacza się bardzo wysoką regioselektywnością względem pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w reakcji acylacji 2'-deoksynukleozydu, jakim jest tymidyna. Natomiast drugi wykazuje selektywność względem grupy 3'tymidyny (identyczną regioselektywnością charakteryzują się także hydrolazy triacyloglicerolowe wyizolowane z komórek *Candida rugosa* oraz z komórek trzustki ludzkiej) (5).

2.4. Stereoselektywność lipaz

Istotną cechą lipaz jest ich stereoselektywność, co oznacza, że w mieszaninie racemicznej związku chemicznego katalizują one przemiany tylko jednego z obecnych w niej cząstek enancjomeru (R)- lub (S)-.

W ostatnich latach zastosowanie enzymów do produkcji związków optycznie czynnych stało się bardzo udaną alternatywą wobec syntezy chemicznej. W szczególności dwie izomeryczne postaci lipazy z *Candida rugosa* (*C. cylindracea*) stały się wszechstronnie wykorzystywanymi katalizatorami reakcji transestryfikacji z udziałem racemicznych mieszanin estrów i alkoholi (6). Innym dużo bardziej specjalistycznym przykładem stereoselektywności jest reakcja estryfikacji (R,S)-ibuprofenu katalizowana przez lipazę typu B z *Candida antarctica*. W zależności od składu mieszaniny reakcyjnej można regulować ilość powstających estrów różnych alkoholi S- izomeru. Szybkość tworzenia estrów przez enancjomer (R)-ibuprofenu zależy od jego stężenia (7).

2.5. Selektwność wobec kwasów karboksylowych

Budowa kwasów tłuszczowych występujących w triacyloglicerolach wpływa na szybkość reakcji enzymatycznych katalizowanych przez lipazy. Efekt położenia rozgałęzienia w cząsteczce kwasu karboksylowego najdokładniej zbadano w reakcji syntezy estrów oktylowych katalizowanej przez lipazę pochodząca z komórek *Rhizomucor miehei* (8). Podstawienie grupy metylowej w pozycje węgla 2, 3 i 4 kwasu tłuszczowego użytego do reakcji spowalniało szybkość estryfikacji odpowiednio o 41, 21 i 84% w porównaniu do kwasu nierozgałęzionego. Podstawienie kwasu grupą etylową całkowicie hamowało przebieg reakcji.

Lipaza wyizolowana z komórek *Geotrichum candidum* jest przykładem enzymu o wysokiej selektywności wobec kwasu tłuszczowego. Katalizuje ona prawie wyłącznie hydrolizę estrów izomerów cis- nienasyconych kwasów tłuszczowych zawierających podwójne wiązanie w pozycji 9 (cis- Δ 9), czyli np. kwasów: oleinowego, linolowego, linolenowego (9).

Lipazy wykazują także selektywność względem ilości wiązań podwójnych w cząsteczce kwasu tłuszczowego oraz ich konformacji (cis-, trans-). Wynikają z tego różnice w wydajnościach reakcji estryfikacji względem poszczególnych kwasów. Właściwość taką posiadają preparaty uzyskane z komórek *Candida rugosa* (*C. cylindracea*), *Mucor miehei* oraz z *Candida antarctica* (10).

3. Zastosowania lipaz

3.1. Przemysł mleczarski

Lipazy są szeroko wykorzystywane w przemyśle mleczarskim do hydrolizy tłuszczu mleka. Preparaty lipaz służą głównie do polepszenia walorów smakowych serów i przyspieszenia procesu ich dojrzewania.

Kwasy tłuszczowe, uwolnione podczas działania lipaz na tłuszcz mleka, obdarzają sery specyficznym smakiem i aromatem. Użycie lipaz uwalniających głównie kwasy o krótkich łańcuchach (C4, C6) przyczynia się do powstania serów o ostrym posmaku i zapachu. Z kolei zastosowanie lipaz uwalniających kwasy o średniej długości łańcucha (C12, C14), nadaje serom smak słodki. Uwolnione kwasy tłuszczowe biorą także udział w reakcjach chemicznych i są przekształcane z udziałem mikroflory obecnej w serach. Wszystkie te czynniki przyczyniają się do powstawania związków takich jak acetoctany, ketokwasy, ketony metylowe, laktony, oraz całego szeregu estrów, które kształtują smak serów (11).

Tradycyjnymi, stosowanymi od lat źródłami lipaz służących do podniesienia smaku serów, są tkanki zwierzęce, takie jak trzustka świńska i bydlęca oraz pregastryczne lipazy zwierzęce. Handlowe preparaty pregastryczne dostępne są w formie: wyciągów płynnych, past oraz proszków.

Dopiero od stosunkowo niedawna w procesach wytwarzania serów zaczęto stosować lipazy pochodzenia mikrobiologicznego. Do tego celu używa się preparatów uzyskanych z grzybów strzępkowych *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus oryzae* oraz kilku innych gatunków. Preparaty takie nie tylko podnoszą walory smakowe i przyspieszają dojrzewanie niektórych serów, ale również w wielu przypadkach całkowicie zastępują preparaty pregastryczne.

Poprzez dodanie odpowiednich lipaz lub ich mieszanin do mleka krowiego uzyskuje się wyroby imitujące sery owcze lub kozie (sery typu Feta, Manchego, Romano).

Lipazy odgrywają znaczącą rolę w przygotowaniu tzw. serów modyfikowanych enzymatycznie EMC (*Enzymatic Modified Cheese*). Są to sery inkubowane w podwyższonej temperaturze i w obecności enzymów w celu wytworzenia preparatu smakowego, który służy jako dodatek do innych produktów spożywczych takich jak: sosy, zupy, przyprawy, przekąski. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w EMC jest 10 razy większe niż w innych serach (12).

3.2. Produkcja estrów smakowych

Zastosowanie preparatów lipaz pochodzenia mikrobiologicznego pozwoliło na zsyntetyzowanie wielu estrów smakowych drogą transestryfikacji. Lipazy wykorzystano także w produkcji estrów etylowych kwasów alifatycznych. Katalizują one syntezę estrów etylowych kwasów od heksanowego do oleinowego. Stwierdzono, że szybkość reakcji zależy od długości łańcucha kwasu, największą szybkość uzyskano dla kwasu dekanowego (13). Estry etylowe tych kwasów, głównie heksanowego i laurynowego, o aromacie owocowym używane są w dużych ilościach w przemyśle spożywczym. Prowadzone były także badania nad wykorzystaniem lipaz w reakcjach estryfikacji rozgałęzionych alkoholi pierwszorzędowych (od etanolu do heksanolu) z wymienionymi kwasami. Również w tym przypadku największą szybkość reakcji stwierdzono dla kwasu dekanowego (13).

Zmodyfikowana lipaza z *Candida rugosa* (Span 85[®]) została wykorzystana jako katalizator reakcji estryfikacji geraniolu i kwasu octowego w izooktanie (14). Produkt, octan geranylu, jest ważnym składnikiem substancji smakowych i zapachowych.

3.3. Wytwarzanie kwasów tłuszczowych, mono- i diacylogliceroli

Hydroliza tłuszczów była pierwszym obszarem przemysłowych zastosowań lipaz. W produkcji czekolady preparaty lipaz powodują powstawanie kwasów tłuszczowych poprawiających smak i aromat produktów czekoladowych. W cukiernictwie wykorzystywane są do hydrolizy pozostałości tłuszczu w suchej albuminie jaj zwiększając tym samym zdolność tworzenia piany i poprawiając jakość (smaku i wyglądu) wyrobów cukierniczych. W produkcji jedwabiu lipazy wykorzystywane są do odtłuszczenia fibroiny.

Chemiczne procesy hydrolizy tłuszczów, prowadzone w obecności katalizatorów nieorganicznych są wprawdzie efektywne, ale powodują powstawanie niepożądanych produktów ubocznych, np. polimerów wyższych kwasów tłuszczowych czy węglowodorów. W porównaniu z nimi enzymatyczne metody hydrolizy mają cały szereg zalet: możliwość otrzymania produktów o pożądanej budowie chemicznej, brak produktów ubocznych, umiarkowane warunki prowadzenia procesu powodujące ich mniejszą energochłonność (15).

Częściowa hydroliza olejów, prowadząca do powstania di-, a następnie monoacylogliceroli, jest kolejnym możliwym zastosowaniem enzymatycznej hydrolizy tłuszczów w celu wytworzenia produktu o wartości handlowej (16,17). Dobór odpowiedniej sn 1,3-selektywnej lipazy i warunków reakcji prowadzi do produkcji różnych mono- i diacylogliceroli.

Monoacyloglicerole są powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym jako dodatki do żywności. Ich właściwości chemiczne powodują, że są wykorzystywane jako emulgatory czy też środki pianotwórcze lub żelujące, do produkcji fosfolipidów oraz wiązania związków smakowo-zapachowych. Powszechnie są także używane jako zamienniki tłuszczu w produktach mleczarskich o zmniejszonej jego zawartości.

Alternatywną do hydrolizy metodą otrzymywania mono- i diglicerydów z triglicerydów jest ich alkoholiza, również katalizowana przez lipazy. Dokładne poznanie tego procesu może stworzyć nowe możliwości przemysłowych zastosowań lipaz. W badaniach przeprowadzonych przez Millqvista i wsp. (18) wykorzystano 22 preparaty lipaz immobilizowanych na nośnikach, do katalizowania reakcji etanolizy: triglicerololaurynianu, triglicerolokaprynianu i triglicerolopalmitynianu w obecności rozpuszczalników organicznych. Celem badań było uzyskanie maksymalnego stężenia diacylogliceroli. Okazało się, że największe wydajności procesu uzyskuje się w reakcjach przy udziale biokatalizatorów pochodzących z komórek *Penicillium* sp. W reakcji katalizowanej przez lipazę z *Penicillium roquefortii*, otrzymano ponad 75% wydajność alkoholizy dilaurynianu. W powstałej mieszaninie reakcyjnej 95% produktu stanowił 1,2-dilaurynian. Ten sam zespół badaczy przeprowadził także badania reakcji alkoholizy triglicerydów, prowadzonej przy udziale immobilizowanej na celiście lipazy z *Rhizopus arrhizus*, której celem było otrzymanie izomerycznie czystych 2-monoglicerydów. Zbadano wpływ rodzaju alkoholu i jego stężenia na przebieg reakcji. Najwyższą wydajność (97%) otrzymano dla etanolu (19).

Innym sposobem otrzymywania mono- i diacylogliceroli jest enzymatyczna gliceroliza. Jako substraty można stosować zastosowany cały szereg związków tłuszczowych: oleje roślinne oraz tłuszcze pochodzenia zwierzęcego. O szybkości i wydajności glicerolizy decyduje wiele czynników, m.in. rodzaj biokatalizatora i substratu oraz ich wzajemne stosunki ilościowe, a także zawartość wody w układzie reakcyjnym. Czynnikiem, od którego w dużej mierze zależy wydajność procesu jest temperatura. Optymalna temperatura glicerolizy zależy od temperatury topnienia używanego tłuszczu (20).

Możliwe jest także otrzymywanie mono- i diacylogliceroli w reakcji estryfikacji prowadzonej w rozpuszczalnikach organicznych z udziałem lipaz (21).

3.4. Synteza strukturyzowanych triacylogliceroli

Właściwości i wartość handlowa olejów i tłuszczów zależy od rodzaju kwasów tłuszczowych wchodzących w ich skład. Tradycyjnie poprawę właściwości tłuszczów

niskiej jakości uzyskuje się poprzez dodanie naturalnych tłuszczów i olejów o różnym składzie, albo w reakcjach transestryfikacji, przy udziale katalizatorów alkalicznych. Działanie katalizatorów alkalicznych jest jednak niespecyficzne, skutkiem czego nie uzyskuje się produktów o pożądanej charakterystyce fizykochemicznej.

Typowym przykładem wysokowartościowej mieszaniny asymetrycznych triglicerydów jest masło kakaowe. Zawiera ono przeważnie w pozycjach sn 1,3 kwasy tłuszczowe nasycone, a w pozycji sn 2 jednonienasycony kwas oleinowy (kwas cis-9-oktadekanowy). Kwasy oleinowy, stearynowy i palmitynowy stanowią ponad 95% wszystkich kwasów zawartych w maśle kakaowym. Najważniejszą właściwością opisywanego produktu, decydującą o jego zastosowaniu, jest krystaliczna struktura i bardzo wyraźny zakres temperatur topnienia (25-35°C). W temperaturze pokojowej ma ono postać kruchego ciała stałego, ale kompletnie się rozpuszcza po włożeniu do ust, nie pozostawiając przy tym tłustego posmaku. Sposób produkcji pochodnych masła kakaowego przy zastosowaniu sn 1,3-selektywnych lipaz został dobrze poznany i opatentowany ok. 20 lat temu przez firmy Unilever i Fuji Oil. W obydwu przypadkach proces ten polegał na prowadzonych przy udziale lipazy procesach: transestryfikacji i kwasolizy taniego oleju, takiego jak np. olej palmowy (frakcja średnia), odpowiednio triglicerolostearynianem lub kwasem stearynowym. Procesy prowadzono w sposób ciągły lub okresowy, bez użycia dodatkowego rozpuszczalnika. Unilever zaniechał jednak prowadzenia procesu ze względu na znaczny spadek cen masła na światowym rynku, ale Fuji Oil wciąż produkuje pochodne masła kakaowego (22,23).

Analogiczna metoda jest stosowana przy otrzymywaniu strukturyzowanych triglicerydów (*structured triglycerides*) posiadających cenne właściwości odżywcze lub dietetyczne. Dla przykładu, 1,3-oleilo-2-palmityloglicerol (OPO) jest ważnym składnikiem w żywieniu niemowląt. Tłuszcz mleka ludzkiego zawiera kwas palmitynowy w pozycji 2-, który jest bardzo dobrze wchłaniany w organizmie niemowlęcia, jednak tłuszcze wchodzące w skład płynów ustrojowych noworodka zawierają kwas palmitynowy w pozycjach 1,3-. Jego uwalnianie może prowadzić do tworzenia się słabo wchłanialnych soli wapniowych (mydeł) tego kwasu, co przejawia się niestrawnością oraz ubytkiem wapnia z organizmu. Substratem do syntezy OPO *in vitro* jest tripalmitynian glicerolu (otrzymywany z olejów roślinnych). Proces wytwarzania jest dwustopniowy – najpierw zachodzi etanoliza z pozycji 1,3- w wyniku, której uzyskuje się 2- monopalmitynian, a następnie prowadzi się estryfikację kwasem oleinowym w pozycjach 1,3- uzyskując OPO. Najlepsze rezultaty odnotowano wykorzystując sn 1,3-selektywne lipazy z *Rhizopus delemar* i *Rhizomucor miehei* (24).

Acidoliza katalizowana przez sn 1,3-selektywne lipazy umożliwia także wytwarzanie innej grupy produktów o ważnej wartości odżywczej: średniołańcuchowych triglicerydów kwasów oktanowego i dekanowego. Powszechną medyczną praktyką jest podawanie tych związków jako leków dla ludzi ze zdiagnozowaną niewydolnością trzustki oraz przy innych zaburzeniach wchłaniania. Związki te, w porównaniu z triglicerydami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, łatwiej ulegają hy-

drolizie przez esterazy trzustkowe. Przyjmowanie triglicerydów zawierających reszty kwasu oktanowego i dekanowego nie zapewnia dostarczenia organizmowi wszystkich potrzebnych kwasów tłuszczowych i dieta taka może prowadzić do wystąpienia ich niedoboru u pacjentów. Problem ten został rozwiązany przez syntezę triglicerydu zawierającego w pozycji 1,3- kwas oktanowy lub dekanowy, a w pozycji 2- kwas tłuszczowy niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu (25).

Lipazy wykorzystano również do modyfikacji olejów bogatych w wartościowe omega-3 wielonienasycone kwasy tłuszczowe takie jak: kwas arachidonowy, pięcienienasycony kwas arachidynowy (EPA, kwas ejkzopentaenowy) czy sześcienienasycony kwas behenowy (DHA, kwas dokozaheksaenowy), które są składnikami olejów wątroby ryb. Kwasy te otrzymano w postaci monoglicerydów (w oleju z wątroby dorsza występują one przeważnie w pozycji 2-), poprzez alkoholizę (etanolizę oraz propanolizę) oleju, a także przez hydrolizę, przy użyciu lipaz sn 1,3-selektywnych (26). Kwasy te są składnikami żywności funkcjonalnej, czyli są niezbędne w diecie, a także są wykorzystywane w leczeniu niektórych chorób i dolegliwości. Przemysłowe zainteresowanie tymi kwasami skupia się również na ich wykorzystaniu do produkcji kosmetyków – kremów i maści (27).

Immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica* wykorzystano do częściowej etanolizy oleju z tuńczyka. W jej wyniku otrzymano mieszaninę estrów etylowych, z których następnie wydzielany był ester etylowy sześcienienasyconego kwasu behenowego (E-DHA). Po 48 godzinach wydajność procesu wyniosła 95% względem odpowiadających im kwasów tłuszczowych. Estrы etylowe pięcienienasyconego kwasu arachidynowego (E-EPA), pozyskiwane z oleju z sardynek są używane w Japonii od 1991 r. do leczenia objawów arteriosklerozy i hiperlipidemii. E-DHA odznacza się podobnymi, a nawet lepszymi właściwościami niż E-EPA (28).

3.5. Modyfikacje fosfolipidów

Podstawowymi składnikami błon biologicznych są fosfolipidy. Ich właściwości zależą od rodzaju kwasów tłuszczowych (część niepolarna) występujących w cząsteczce i od polarnej grupy funkcyjnej połączonej z grupą fosforanową. Dzięki doskonałej zdolności tworzenia emulsji, fosfolipidy (głównie lecytyny) i produkty ich częściowej hydrolizy – lizofosfatydy (monoacylofosfoglicerole), znalazły liczne zastosowania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym i in. (29).

Lecytyny (fosfatydylocholiny) to estry glicerolu, w której dwie grupy hydroksylo- we są zestryfikowane kwasami tłuszczowymi, a trzecia podstawiona jest resztą kwasu ortofosforowego zestryfikowanego choliną. Głównym źródłem surowych lecytyn używanych w praktyce są: żółtka jaj kurzych i nasiona roślin oleistych. Przez zmianę równowagi hydrofilowo-lipofilowej w cząsteczkach fosfolipidów, za pomocą fosfolipaz oraz lipaz, możliwe jest przekształcenie surowych lecytyn w preparaty o pożądanym właściwościach i ściśle określonym zastosowaniu (30).

Enzymy katalizujące reakcję deacylacji fosfolipidów to: fosfolipaza A1, A2, B oraz lizofosfolipaza. Wymienione enzymy hydrolizują wiązania estrowe w pozycji 1 (fosfolipazy A1 i B) oraz w pozycji 2 (fosfolipazy A2 i B) fosfolipidów i lizofosfatydów. Fosfolipazy: A2 (Lecitase[®], produkowana przez Novo Nordisk A/S), wydzielana z trzustki świńskiej i D, uzyskiwana z komórek *Streptomyces chromofuscus* (Toya Jozo Co. Ltd.) są produkowane na skalę przemysłową. Fosfolipazy A1 i A2 z *Aspergillus* sp. są natomiast produkowane na skalę przemysłową przez koncern Biocatalysts Ltd. (30).

Aktywność względem fosfolipidów wykazuje także kilka oczyszczonych lipaz wydzielonych z komórek: *Staphylococcus hyicus*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor javanicus* oraz z wątroby ludzkiej. Porównywano zdolność komercyjnie dostępnych preparatów lipaz i fosfolipaz do reakcji hydrolizy fosfolipidów z oleju sojowego (29). Testowano: lipazy grzybów pochodzące z *Aspergillus niger* i *Penicillium cyclopium*; dwie fosfolipazy A1 i A2 (także z *Aspergillus niger*) oraz fosfolipazę A2 uzyskaną z komórek trzustki świńskiej (Lecitase[®]). Okazało się, że obydwie badane lipazy wykazały większą wydajność hydrolizy fosfolipidów niż fosfolipazy (30).

Preparaty lipaz pochodzenia mikrobiologicznego wykorzystywano także w reakcji transestryfikacji dimiristoilofosfatydylocholino kwasem oleinowym. Proces prowadzono przy udziale lipaz z *Rhizomucor miehei* i *Aspergillus niger* bez rozpuszczalnika organicznego lub w jego obecności. Na przebieg reakcji transestryfikacji wpływ miała zarówno zawartość wody (hydroliza) w mieszaninie reakcyjnej, jak i stężenie wolnych kwasów tłuszczowych. Maksymalną wydajność zmodyfikowanej fosfatydylocholino (35% w stosunku do substratu wyjściowego) osiągnięto z immobilizowaną na duolicie lipazą z komórek *Rhizomucor miehei* (Lipozyme[®]) (30).

3.6. Produkcja środków piorących

Do początku lat dziewięćdziesiątych lipazy nie odgrywały znaczącej roli w produkcji proszków do prania, głównie z powodu braku preparatów, które byłyby wystarczająco stabilne i aktywne w środowiskach alkalicznych. Potrzeby rynku doprowadziły do wzrostu zapotrzebowania na preparaty enzymatyczne mogące usuwać tłuste plamy w niskich temperaturach (około 40°C).

Pierwszym preparatem enzymatycznym lipaz wykorzystanym w proszkach do prania była Lipolase[®], firmy Novo Nordisk A/S. Był to także pierwszy preparat enzymatyczny uzyskany dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej i produkowany na skalę przemysłową. Preparat ten był składnikiem wielu markowych proszków na całym świecie. Produkcja drugiej generacji Lipolase[®], zwanej Lipolase Ultra[®], z ulepszoną zdolnością prania, została uruchomiona w 1994 r. W 1998 r. stworzono LipoPrime[®], który jest zmodyfikowaną metodami inżynierii białkowej formą Lipolase[®]. LipoPrime[®] przejawia wyższą skuteczność w usuwaniu tłuszczów w porównaniu ze swoimi poprzednikami (12).

Lipazy znalazły także zastosowanie w procesach wytwarzania tzw. aktywatorów wybielaczy. Związki te posiadają reaktywną grupę acylową i w wyniku rzkładu nadtlenku wodoru katalizują reakcje powstawania nadtlenokwasów karboksylowych. Nadtlenokwasy karboksylowe są odpowiedzialne za usuwanie różnego rodzaju plam. W ciągu ostatnich kilkunastu lat aktywatory wybielaczy stały się ważnym składnikiem środków piorących. Najbardziej znane i najpowszechniej używane to: TAED (tetraacetyloetylenodiamina), PAG (1,2,3,4,6-penta-O-acetylo-D-glukoza i NOBS (nonanoylobenzenosiarczan sodu). W reakcji z nadtlenkiem wodoru TAED PAG tworzą kwas nadooctowy, a NOBS tworzy kwas nadnonanowy. Pierwsze dwa są skuteczne w usuwaniu plam z kawy i herbaty, natomiast NOBS, jako bardziej hydrofobowy, usuwa plamy, np. z trawy czy z sosu pomidorowego.

W ostatnich latach powstała nowa klasa „wywabiaczy” plam, które zapewniają usuwanie wielu różnych zabrudzeń jednocześnie. Preparaty te łączą w sobie cechy nadtlenokwasu octowego i nadtlenokwasów hydrofobowych. Przedstawicielem tej grupy związków jest: 1-O-dekanoylo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukoza. Nie udało się dotąd opracować czysto enzymatycznej syntezy tego związku, a to została opracowana metoda enzymatyczno-chemiczna, polegająca na wykorzystaniu lipazy z *Candida antarctica* do selektywnej hydrolizy PAG. Powstający produkt jest przekształcany chemicznie (z udziałem katalizatora nieorganicznego) do 1-O-dekanoylo-2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukozy (31).

3.7. Surfaktanty

Przy udziale preparatów lipaz zostało zsyntetyzowanych wiele związków powierzchniowo czynnych. Zalicza się do nich między innymi: mono- i dicyloglicerole, estry kwasów tłuszczowych i węglowodanów, alkiloglikozydy, aniony kwasów tłuszczowych oraz lizofosfatydy.

Estry kwasów tłuszczowych i węglowodanów są szeroko używane jako detergenty przemysłowe oraz jako emulgatory wchodzące w skład różnych wyrobów przemysłu spożywczego, takich jak: sosy, majonezy, śmietanki, lody, margaryny, pasty. Wadami chemicznych metod produkcji tych związków, podobnie jak w przypadku przeróbki olejów, jest wysoka energochłonność, a także powstawanie niepożądanych produktów ubocznych. Niedogodnością związaną z enzymatyczną syntezą estrów węglowodanów jest nierozpuszczalność niektórych reagentów w rozpuszczalnikach stosowanych w praktyce (węglowodany są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych natomiast kwasy tłuszczowe w apolarnych). W celu zwiększenia rozpuszczalności cukrów w rozpuszczalnikach organicznych mogą być one modyfikowane, np. przez acetylację (32). Chcąc ominąć problem rozpuszczalności węglowodanów w rozpuszczalnikach organicznych, podjęto próby prowadzenia estryfikacji prostych alkiloglikozydów w środowisku bez dodatkowego rozpuszczalnika, używając do tego celu stopionych kwasów tłuszczowych i immobilizowane na nośniku

lipazy z *Candida antarctica*. Badano przebieg reakcji w zakresie temperatur 60-80°C. W tych warunkach stosowany preparat lipaz wykazał się doskonałą regioselektywnością. Uzyskano różne 6-O-alkilglukopiranozydy z wydajnością dochodzącą do 90% (z równomolowej ilości substratów w początkowej mieszaninie reakcyjnej). Ponadto stwierdzono, że synteza jest opłacalna ekonomicznie, a produkty nie są toksyczne i szybko ulegają biodegradacji. Na podstawie analizy ekonomicznej koncern Novo Nordisk A/S zastosował ten proces w pilotowej instalacji (33).

Mono- i diestry monosacharydów można, uzyskać z wysokimi wydajnościami używając jako substratu w reakcji enzymatycznej acetalu tych sacharydów (34).

Lipaza z *Chromobacterium viscosum*, a także lipaza z trzustki świnińskiej, zostały wykorzystane do transestryfikacji alkoholowych pochodnych cukrów (np. D-sorbitolu, D-mannitolu, rybitolu, ksylitolu) z olejami pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w pirydynie jako rozpuszczalniku. Produkty reakcji, monoestry wymienionych alkoholi i kwasów tłuszczowych, są znakomitymi surfaktantami – znacznie obniżają napięcie międzyfazowe i stabilizują emulsję (35).

Badano także reakcje acylacji kilku piranoz oraz fruktozy kwasami tłuszczowymi w fazie stałej, w których biokatalizatorem były różne preparaty lipaz. Największą selektywność w reakcji estryfikacji wykazała lipaza B z *Candida antarctica* immobilizowana na propylenie EP 100. Używany w niewielkich ilościach rozpuszczalnik organiczny służył tylko do wytworzenia fazy płynnej umożliwiającej zajście reakcji. Dla β -D-glukozy uzyskano 98% wydajności mono- i tylko 2% produktu diacylowanego kwasem palmitynowym w *tert*-butanolu. Nieco niższą selektywność zaobserwowano dla D-mannozy (75% produktu monoacylowanego) oraz dla D-galaktozy (50% wydajności). Różnice w wydajności wynikają prawdopodobnie z innej orientacji grupy hydroksylowej w pozycji C2. W przypadku fruktozy jako substratu, duże znaczenie miała długość łańcucha kwasowego i dobór rozpuszczalnika organicznego (36).

3.8. Kosmetyki

W przemyśle kosmetycznym szeroko stosowane są estry kwasów tłuszczowych jako tzw. emolienty – substancje pomagające w utrzymaniu gładkiej i sprężystej skóry oraz zapewniające odpowiedni jej stopień nawilżenia (37).

Koszty zastosowania lipaz w procesach transestryfikacji są wysokie, jednakże synteza kilku specjalnych estrów jest ekonomicznie umotywowana. Hiszpańska filia koncernu Unichem International rozpoczęła w połowie lat dziewięćdziesiątych produkcję mirystynianu i palmitynianu izopropylu, a także palmitynianu 2-etyloheksylu. W tym procesie jako biokatalizatora używa się immobilizowanej lipazy z *Rhizomucor miehei*. W układzie nie stosuje się dodatkowego rozpuszczalnika, a powstającą w trakcie reakcji wodę usuwa się za pomocą destylacji próżniowej. Produkt końcowy jest doskonałej jakości i wymaga tylko minimalnego oczyszczenia (12).

W bardzo podobnym ze względów technologicznych procesie (brak rozpuszczalnika i destylacja próżniowa powstającej wody) można przy udziale lipazy z *Candida antarctica* (Novozym 435[®]) otrzymać estry butyloglukozydu i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wysoka wydajność procesu (do 97%) czyni go opłacalnym, ponieważ nie jest konieczne końcowe oczyszczanie produktów. Ważną rolę odgrywa również stabilność operacyjna enzymu – ponad 240 godzin w temperaturze 60°C (38).

Szczególne znaczenie preparaty enzymatyczne mogą odegrać przy otrzymywaniu estrów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Łagodne warunki procesu katalizowanego przez lipazy pozwalają zachować aktywność biologiczną tych kwasów (38).

W przemyśle kosmetycznym są stosowane także estry wosków. Ich wytwarzanie może odbywać się m.in. na drodze procesu enzymatycznego przy użyciu lipaz. W procesie opracowanym przez Croda Universal Ltd. jako biokatalizator posłużył enzym wydzielony z komórek *Candida cylindracea*. Uzyskano produkt o wyższej jakości niż w technologii konwencjonalnej (12).

3.9. Synteza polimerów

Optycznie czynne polimery znalazły zastosowanie jako niesymetryczne reagenty i adsorbenty oraz w badaniach ciekłych kryształów. Polimery te są otrzymywane powszechnie metodami chemicznymi, jednakże ostatnio w literaturze pojawiło się kilka doniesień o zastosowaniu preparatów lipaz w ich syntezie.

Lipazy, a także enzymy proteolityczne są używane jako biokatalizatory w reakcji syntezy polimerów typu AA – BB i A – B. Proces ten polega na polikondensacji pochodnych kwasów dikarboksylowych (AA) z diolami (BB). Zastosowanie enzymów pozwala na użycie jako substratów mieszanin racemicznych monomerów (39).

Znakomitą stereoselektywnością w reakcji politransestyfikacji mieszanin racemicznych diestrów i achiralnych dioli lub mieszanin racemicznych dioli i achiralnych diestrów, wykazały się lipazy z *Aspergillus niger* oraz z trzustki wieprzowej. Wadą reakcji katalizowanej enzymatycznie jest jednak otrzymywanie tylko produktów oligomerycznych (40).

Lipazy wykorzystano także w reakcji polimeryzacji estru bis-2,2,2-trifluoroetylowego kwasu sebacynowego (ester kwasu dikarboksylowego) z diolami alifatycznymi, np. z 1,4-butanodiolem. Proces prowadzony był w temperaturze 37°C. Jako rozpuszczalnik zastosowano eter difenyłowy. W celu usunięcia powstającego w konkurencyjnej reakcji 2,2,2-trifluoroetanolu reakcję polimeryzacji prowadzono pod obniżonym ciśnieniem. Z czterech badanych lipaz, najefektywniejsza okazała się lipaza z *Rhizomucor miehei* w postaci proszku. Podczas badań uzyskano alifatyczny poliestr o średniej masie cząsteczkowej 46,4 kDa (41).

Preparaty lipaz wykorzystano także do syntezy polimerów aromatycznych. W reakcji transestryfikacji 1,6-heksanodiolu z kwasem 1,3-benzenodikarboksylowym (izo-

ftalowym) uzyskano poliizoftalan 1,6-heksanodiyliu. Biokatalizatorem reakcji była immobilizowana lipaza B z *Candida antarctica* (Novozym 435®). W procesie uzyskano polimer o średniej masie ponad 50 kDa. W trakcie badań okazało się, że istotnym czynnikiem w reakcji polimeryzacji prowadzonej przez lipazy, jest położenie grupy karboksylowej w pierścieniu benzenowym (enzym nie katalizował reakcji z kwasem 1,4-benzenodikarboksylowym jako substratem) (42).

Oprócz syntezy polimerów, lipazy znalazły zastosowanie także w procesach rozkładu poliestrów. Zdolność katalizowania takiej reakcji przejawia np. enzym uzyskany z komórek *Rhizopus delemar* (43). Tego rodzaju właściwości lipaz pochodzenia mikrobiologicznego mogą w przyszłości okazać się pomocne w badaniach nad biodegradacją niektórych rodzajów tworzyw sztucznych.

Interesującym rozwiązaniem w syntezie poliestrów może być wykorzystanie preparatów lipaz w etapie przygotowania optycznie czynnych monomerów, natomiast sama reakcja polimeryzacji przebiegałaby na drodze konwencjonalnego procesu chemicznego.

3.10. Synteza nadtlenokwasów

Jednym z przykładów szerokiej specyficzności substratowej lipaz jest ich zdolność do katalizowania reakcji syntezy nadtlenokwasów karboksylowych (-COOOH) z odpowiednich kwasów karboksylowych i nadtlenku wodoru. Najwyższą konwersję substratu (>40%) otrzymano w procesie katalizowanym przez immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica* (44).

Powstające w środowisku reakcyjnym nadtlenokwasy mogą być używane jako substraty w reakcjach następczych. Możliwe jest połączenie katalizowanej enzymatycznie reakcji powstawania nadtlenokwasów z reakcją epoksydacji alkenów. Proces przeprowadza się w obecności kwasu karboksylowego. W niektórych przypadkach reagujący alken może stanowić rozpuszczalnik. Przykładem może być reakcja epoksydacji cykloheksenu traktowanego odpowiednią ilością kwasu karboksylowego, o długim lub średniej długości łańcuchu, z nadtlenkiem wodoru i katalityczną ilością preparatu lipazy. Lipazy mogą być także użyteczne w procesach syntezy ważnych w przemyśle chemicznym tlenków alkenów, które powstają w wyniku utleniania długołańcuchowych alkenów z terminalnym wiązaniem podwójnym (45).

3.11. Przemysł papierniczy

Lipofilowe żywice występujące w drewnie stwarzają wiele trudności w różnych etapach produkcji papieru. Gromadzą się m.in. w młynach do mielenia drewna, ich aglomeraty przyklejają się do różnych części maszyny papierniczej, a wreszcie pojawiają się na papierze w postaci „brudnych” punktów: mogą nawet prowadzić do

tworzenia się dziur. Występowanie żywic w masie celulozowej powoduje szereg utrudnień podczas procesu wytwórczego papieru, np. jest przyczyną przerw w produkcji, obniża jakość produktu końcowego, przyspiesza proces żółknięcia papieru i zwiększa ilość związków chloru potrzebnych do chlorowania miazgi drzewnej w celu jej wybielenia. Chemiczna metoda wytwarzania pulpy drzewnej, czyli jej gotowanie w obecności siarczanów w środowisku zasadowym, powoduje obniżenie zawartości żywicy, ale jej całkowicie nie eliminuje.

Opracowano metodę enzymatycznej redukcji ilości substancji żywicznych w drewnie miękkim (brzoza, sosna). Głównymi składnikami kleistych żywic są: triacyloglicerole, kwasy tłuszczowe oraz kwasy żywiczne. Znaczące zmniejszenie trudności technologicznych osiągnięto dzięki usunięciu triacylogliceroli z pulpy drewna miękkiego, wytwarzanej metodą mechaniczną, przy udziale preparatu lipazy z *Aspergillus* sp. (Resinaza[®] A 2X) firmy Novo Nordisk A/S. Preparat ten jest produkowany i sprzedawany prawie wyłącznie do tego celu. Przedstawiona metoda z powodzeniem została zastosowana w fabryce papieru Nippon Paper Co. oraz w innych japońskich zakładach papierniczych (46).

3.12. Produkcja paliw

Termin biodiesel określa paliwa, składające się z estrów kwasów tłuszczowych, stosowane w silnikach wysokoprężnych (silnikach Diesela). Pozwalają one ograniczyć zużycie ropy naftowej, ulegają biodegradacji, a ponadto w porównaniu do oleju napędowego produkty spalania biodiesla odznaczają się mniejszą zawartością tlenu węgla i w niektórych przypadkach tlenków azotu. Istotną zaletą jest także możliwość produkcji biodiesla z surowców odnawialnych lub odpadowych. W konsekwencji to alternatywne paliwo jest przedmiotem rosnącego zainteresowania oraz licznych badań (47).

Jako paliwo silnikowe służyć mogą także triacyloglicerole, jednakże z uwagi na wiele trudności z ich technicznym wykorzystaniem, przede wszystkim wysoką lepkość, uwagę naukowców skupiły pochodne tych związków, głównie estry metylowe kwasów tłuszczowych. Obecnie, w Europie i Ameryce Północnej, biodiesel jest produkowany w procesie alkoholizacji olejów roślinnych, a w Japonii także z odpadów organicznych. W procesie wytwórczym wykorzystuje się metody chemiczne, posiadające liczne wady (trudności z odzyskiem glicerolu, konieczność usunięcia katalizatora chemicznego, duża energochłonność). Metody biochemiczne z użyciem preparatów lipaz mogą być bardziej efektywne, jednakże z uwagi na wysokie koszty enzymów nie zostały dotąd zastosowane na skalę przemysłową (48).

W dotychczasowych badaniach wykazano, że najbardziej efektywne w produkcji biodiesla są preparaty lipaz uzyskane z komórek *Rhizomucor miehei* oraz z *Candida antarctica*. W doświadczeniach jako substratów użyto olejów roślinnych (sojowego, rzepakowego), odpadowego (wykorzystanego) oleju z zakładów gastronomicznych

oraz krótkołańcuchowych alkoholi (metanol, etanol, izopropanol, butanol, izobutanol). W reakcji z alkoholami pierwszorzędowymi, największą wydajność zapewnia lipaza pleśniowa, natomiast proces alkoholizy z alkoholami drugorzędowymi najefektywniej zachodzi przy udziale preparatu drożdżowego (powstają estry o rozgałęzionych łańcuchach) (49).

Przydatność preparatu z *Candida antarctica* w otrzymywaniu biodiesla potwierdzono w badaniach reakcji metanolizy olejów roślinnych (mieszanki oleju sojowego i rzepakowego) z użyciem różnych lipaz. Najwyższą wydajność stwierdzono dla enzymu unieruchomionego na nośniku (Novozym 435[®]) (48).

3.13. Biosynteza leków i środków ochrony roślin

Wzrost zainteresowania użyciem optycznie czystych enancjomerów w produkcji leków i środków ochrony roślin spowodowany jest tym, że wykazują one wyższą skuteczność działania oraz dają mniej efektów ubocznych niż w przypadku gdy do ich produkcji używa się mieszanin enancjomerów. Aktywność biologiczna i metabolizm optycznie czystego enancjomeru mogą być odmienne niż właściwości mieszaniny racemicznej. Zwykle tylko jeden z nich posiada właściwości lecznicze.

Wiele firm farmaceutycznych stosuje preparaty lipaz do produkcji optycznie czystych półproduktów w ilościach przemysłowych. Istnieją też małe firmy biotechnologiczne (np. Enzymatix, Wielka Brytania), w których wyspecjalizowano się w wytwarzaniu, z użyciem lipaz, kilku półproduktów (12).

Lipazy mogą katalizować rozkład pochodnych kwasu propionowego podstawionych w pozycji 2- pochodnymi reszty arylowej. Produkty rozkładu tych związków: izomery (R)- i (S)- kwasu fenoksypropionowego służą do produkcji enancjomerycznie czystych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (50). Produkty rozkładu kwasów 2-halopropionowych są także materiałem wyjściowym do syntezy herbicydów fenoksypropionianowych. Produkcja tych środków ochrony roślin z wykorzystaniem lipaz, prowadzona była przez Chemie Linz Co. (Austria) (51).

Katalizowana enzymatycznie przez lipazy reakcja hydrolizy octanu 1-(4-fenoksyfenoksy)-2-propylu w układzie woda – nierozpuszczalny substrat, została przeprowadzona w celu otrzymania analogu owadziego hormonu juwenilnego. Hormony tego typu są używane w wysoko selektywnych insektycydach, będących regulatorami wzrostu owadów. Prawie wszystkie badane lipazy hydrolizowały enancjomer (R), a największą selektywnością i aktywnością wyróżnił się preparat uzyskany z komórek *Pseudomonas cepacia*. Hydrolizie poddano także z powodzeniem octan 2-(4-fenoksyfenoksy)-1-propylu (52).

W japońskim koncernie Tanabe wykorzystuje się na skalę przemysłową stereoselektywność lipaz w procesie rozdziału mieszaniny racemicznej (2R,3S)-3-(4-metoksyfenolo)glicamidu, tylko jeden enancjomer jest bowiem stosowany jako lek w kardiologii (53).

W brytyjskim koncernie Glaxo Wellcome korzysta się ze zdolności katalitycznej lipaz w produkcji (1S,2S)-trans-2-metoksycykloheksanolu, który to związek jest następnie używany w syntezie β -laktamowych antybiotyków (53).

W amerykańskiej firmie Sepracor Inc. produkuje się przy udziale lipaz na skalę wielu kilogramów (2R, 3S)- ester metylo-metoksyfenyloglicydolu, podstawowy produkt pośredni w wytwarzaniu optycznie czystego leku działającego na układ krążenia człowieka (12).

4. Perspektywy aplikacji lipaz

W artykule omówiono wybrane, najbardziej specjalistyczne zastosowania preparatów lipaz, opracowane głównie podczas ostatniego dziesięciolecia. Większość nich wdrożono do przemysłowego wykorzystania w wielkich ogólnościowych koncernach chemicznych i biotechnologicznych, a także w mniejszych firmach działających w tych obszarach.

Powodami nie spotykanego w innej grupie enzymów biotechnologicznego potencjału lipaz są przede wszystkim:

- unikatowa zdolność katalizowania reakcji w rozpuszczalnikach organicznych;
- przejawianie wielu rodzajów specyficzności substratowej i działania;
- wykazywanie wysokiej stereoselektywności.

W bliskiej przyszłości najważniejszą aplikacją lipaz będzie ich zastosowanie jako biokatalizatorów w procesie otrzymywania enancjomerycznie czystych produktów, które niejednokrotnie są substancjami biologicznie czynnymi.

Biotechnologiczny potencjał zastosowań mikrobiologicznych lipaz ciągle się rozszerza, przede wszystkim dzięki wykorzystaniu nowoczesnych technik doświadczalnych biologii molekularnej, które pomagają dopasować lipazy do różnorodnych zastosowań przemysłowych. Jednak w dalszym ciągu tylko kilka lipaz jest używanych w syntezie organicznej na skalę przemysłową. Dzieje się tak ze względu na trudności w opłacalnym procesie powiększania skali procesu od laboratoryjnej do przemysłowej.

Rozszerzenie możliwych przemysłowych zastosowań lipaz związane jest także z projektowaniem i „wytwarzaniem” selektywnych enzymów nowymi metodami, w których ogromną rolę odgrywa inżynieria białkowa. Przykładem może być metoda „ewolucji *in vitro*” (ukierunkowanej ewolucji) z powodzeniem zastosowana np. do zwiększania wydajności katalitycznej lipazy *Pseudomonas aeruginosa* (2). Metoda ta pozwala na otrzymywanie enzymów o polepszonych parametrach, decydujących o ich zastosowaniu w przemyśle, tj. termostabilności, aktywności w środowisku rozpuszczalników organicznych, czy też specyficzności substratowej. Dla przykładu, za pomocą odpowiedniego plazmidu wprowadzono wcześniej zmutowany gen lipazy *Pseudomonas aeruginosa* do komórek *Escherichia coli*. Syntetyzowany przez zrekombinowany szczep enzym katalizował ze znacznie większą wydajnością hydrolizę (S)- es-

tru p-nitrofenylowego kwasu 2-metyloodekanowego w mieszaninie (R)- i (S)- racematów tego estru. Uzyskano w ten sposób wzrost stereoselektywności lipazy od 2 (enzym natywny) do 81% (białko zmutowane) (2). Inżynieria białkowa pozwala zatem rozszerzyć przemysłowe zastosowania lipaz oraz otwiera nowe możliwości użytkowania tych enzymów o wszechstronnych właściwościach katalitycznych.

Literatura

1. Macrae A. R., (1983), *Extracellular microbial lipases*, in: Fogarty W. M., *Microbial enzymes & biotechnology*; Applied Science Publishers, London, 225-250.
2. Jaeger K. E., Reetz M. T., (1998), *TIBTECH*, (16), 396-403.
3. Isobe K. et al, (1992), *Eur. J. Biochem.*, 203, 233-237.
4. Sonnet P. E., Bailargeon, M. W., (1991), *Lipids*, 26, 295-299.
5. Wong C. H., Whitesides G. M., (1994), *Thetrahedron*, 12, 41-130.
6. Lundell K. et al, (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 86-93.
7. Peppin P., Lortie R., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 502-505.
8. Sonnet P. E., Bailargeon M. W., (1991), *Lipids*, 26, 295-299.
9. Charton E., Macrae A. R., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 489-493.
10. Warwel et al, (1999), *Biotechnology Letters*, 21, 431-436.
11. Godfrey T., Hawkins D., (1991), *European Food & Drink Review*, 103-107.
12. Vulfson E. N., (1994), *Industrial applications of lipases*, in: Wooley P., Petersen S. P., *Lipases, their structure, biochemistry and application*, Cambridge University Press, 271-288.
13. Talon R. et al, (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 620-622.
14. Huang Sh-Y, Chang H-L, (1999), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 183-187.
15. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (2000), *Biotechnologia*, 2 (49), 120-130.
16. McNeill G. P., Yamane, T., (1991), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 6-10.
17. Bornscheuer U. T., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 578-586.
18. Millqvist A. et al, (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 198-206.
19. Millqvist A., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 1042-1047.
20. Bednarski Wł., Adamczak M., (1999), *Biotechnologia*, 4 (47), 7-23.
21. Kwon S. J. et al, (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 700-704.
22. Macrae A. R., (1983), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 291-294.
23. Macrae A. R., Hammond R. C., (1985), *Biotech. Genet. Engin. Rev.*, 3, 193-217.
24. Schmid U. et al, (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 64, 678-684.
25. Jandacek R. et al, (1987), *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 940-945.
26. Zuyi L., Ward O. P., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 601-606.
27. Sridhar R, Lakshminarayana G., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1041-1043.
28. Watanabe Y. et al, (1999), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 622-626.
29. van Nieuwenhuyzen W., (1981), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58, 886-888.
30. Mustranta A. et al, (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 1415-1419.
31. Kirk O. et al, (1995), *Biocatalysis and Biotransformation*, 12, 91-97.
32. Janssen A. E. M. et al, (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 565-572.
33. Adelhors K. et al, (1990), *Synthesis*, 2, 112-115.
34. Fregapane G. Et al, (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 796-800.
35. Chopineau J. et al., (1988), *Biotech. Bioeng.*, 31, 208-214.
36. Cao L. et al, (1998), *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 249-257.
37. Barry A. Salka, (1997), *Cosmetics & Toiletries*, 112, 101.
38. Bousquet M-P. et al, (1999), *Biotech. Bioeng.*, 63, 730-736.
39. Dordick J. S., (1992), *Trends Biotech.*, 10, 287-293.

40. Margolin A. L. et al, (1987), *Tetrahedron Letters*, 28, 1607-1610.
41. Linko Y-Y. et al, (1998), *Jornal of Biotechnology*, 66, 41-50.
42. Mezoul G. et al, (1996), *Polym. Bull.*, 36, 541-548.
43. Walter T. et al, (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 218-224.
44. Cuperus F. P. et al, (1994), *Biocatalysis*, 9, 89-96.
45. Björkling F. et al, (1991), *Trends. Biotech.*, 9, 360-363.
46. Mustranta A. et al, (1995), *Tappi J.*, 78, 140-146.
47. Haas M. J., Scott K. M., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1497-1504.
48. Shimada Y. et al, (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 789-793.
49. Nelson M. et al., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1191-1195.
50. Sih C. J., Wu S. H., (1989), *Topics in Stereochemistry*, 19, 63-125.
51. Kirchner G., et al. (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7072-7076.
52. Nishizawa K. et al., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 333-339.
53. Schulze B., Wubbolts M. G., (1999), *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 609-615.