

Dr inż. Katarzyna TARNOWSKA
Dr inż. Eliza GRUCZYŃSKA
Prof. dr hab. Bolesław KOWALSKI
Wydział Nauk o Żywności, SGGW w Warszawie

IMMOBILIZACJA FIZYCZNA LIPAZ

Część I

IMMOBILIZACJA LIPAZ PRZEZ ADSORPCJĘ®

Lipazy stanowią bardzo ważną grupę enzymów o wszechstronnych możliwościach wykorzystania w procesach biotechnologicznych. Preparaty lipaz stosowane są w reakcjach syntezy, hydrolizy i modyfikacji tłuszczów, produkcji związków smakowo-zapachowych, rozdziale mieszanin racemicznych i analityce chemicznej.

W artykule przedstawiono problematykę immobilizacji lipaz przez adsorpcję oraz dokonano przeglądu handlowych nośników stosowanych do adsorpcji enzymów lipolitycznych. Szczególną uwagę poświęcono zagadnieniu selektywnej adsorpcji lipaz na nośnikach o silnie hydrofobowej powierzchni.

WPROWADZENIE

Lipazy są enzymami lipolitycznymi, których naturalną funkcją jest katalizowanie reakcji hydrolizy acylogliceroli (hydrolazy acyloglicerolowe EC 3.1.1.3). Źródłem lipaz mogą być mikroorganizmy, organy zwierząt i rośliny. Większość obecnie wytwarzanych preparatów lipaz to enzymy drobnoustrojowe. Ze względu na szerokie spektrum katalizowanych reakcji (np. hydroliza, estryfikacja, transestryfikacja, aminoliza) stanowią bardzo ważną grupę enzymów o wszechstronnych możliwościach wykorzystania przemysłowego. Duże zainteresowanie wzbudza ich wysoka aktywność i stabilność w tzw. układach bezwodnych, czyli w rozpuszczalnikach organicznych i płynach nadkrytycznych. Szczególną zaletą tych biokatalizatorów jest ich specyficzność (selektywność) będąca zarówno kluczem do klasyfikacji lipaz, jak i ich zastosowania [4].

Większość dostępnych na rynku preparatów lipaz to roztwory o różnym stopniu zateżenia i oczyszczenia białka enzymatycznego lub preparaty w formie stałej, których znaczną część stanowią niebiałkowe wypełniacze. Poprzez odpowiednią technikę immobilizacji można dodatkowo zwiększyć stopień czystości lipaz. Ponadto, enzymy w formie immobilizowanej charakteryzują się zwykle lepszymi, procesowo ważnymi właściwościami w porównaniu z ich natywnymi odpowiednikami. W celu unieruchomienia biokatalizatorów – w tym i lipaz – można wybrać jedną z wielu znanych metod immobilizacji. Przykładowo enzym może być związany ze stałym nośnikiem, sieciowany, pułapkowany w matrycy polimeru lub w przestrzeni ograniczonej membraną. W przypadku lipaz, najczęściej stosowaną techniką immobilizacji jest wiązanie białka enzymatycznego z powierzchnią nośnika. Procedura unieruchamiania enzymu oparta jest na wiązaniu kowalencyjnym lub oddziaływaniach fizycznych (adsorpcja).

W artykule [50] przedstawiono problematykę unieruchamiania lipaz metodami chemicznymi, tj. poprzez wiązanie kowalencyjne z nośnikiem oraz sieciowanie.

Celem artykułu jest zaprezentowanie zagadnień związanych z adsorpcją lipaz na różnym typu nośnikach stałych.

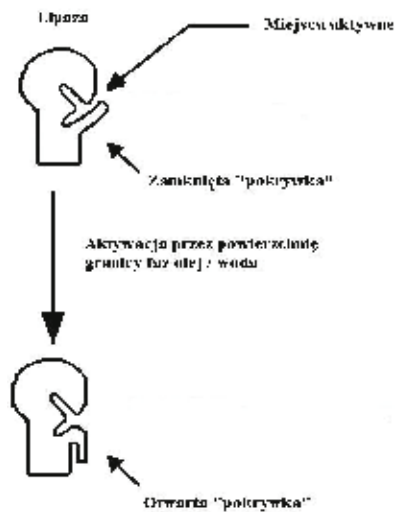
ADSORPCJA LIPAZ NA NOŚNIKACH

Adsorpcja katalizatorów białkowych na powierzchni nośników jest najstarszą i najprostszą metodą immobilizacji. Może być stosowana zarówno do unieruchamiania wyizolowanych enzymów, jak i całych komórek mikroorganizmów. Technika ta jest tania i daje możliwość wielokrotnego użycia adsorbentu. Proces adsorpcji zwykle nie przekracza 2 godzin (czasem trwa nawet kilka minut [6, 8, 17]), więc jest to metoda szybka. W zależności od charakteru nośnika cząsteczki enzymu oddziałują z nim za pomocą wiązań: van der Waalsa, hydrofobowych, wodorowych oraz jonowych. Wadą tej metody jest łatwa desorpcja enzymów, a także możliwość adsorbowania się na nośniku niektórych substratów i produktów reakcji oraz inhibitorów.

Aktywacja międzyfazowa

Adsorpcja jest preferowanym sposobem immobilizacji w procesach prowadzonych w środowiskach niewodnych i o niskiej zawartości wody. Białka enzymatyczne charakteryzuje niskie powinowactwo do rozpuszczalników organicznych, więc w ich obecności nie obserwuje się desorpcji. W przypadku lipaz, adsorpcja na hydrofobowych nośnikach umożliwia katalizę w układach o wysokiej zawartości wody, co związane jest z mechanizmem ich działania katalitycznego. Aktywność większości lipaz jest maksymalna tylko wtedy, gdy stężenie substratu przewyższa zakres rozpuszczalności w wodzie i tworzy się powierzchnia między fazą wodną a tłuszczową. Ta unikatowa właściwość lipaz, po raz pierwszy opisana przez Sarda i Desnuelle w 1958 roku [46], określana jest jako aktywacja międzyfazowa. Jedną z proponowanych hipotez wyjaśniających podstawy molekularne tego zjawiska jest „teoria enzymu”. Zakłada ona zmiany konformacyjne enzymu zachodzące w czasie adsorpcji na granicy faz [48]. Centrum aktywne lipaz ukryte jest pod powierzchnią α -helisowej pętli tworzącej strukturę podobną do pokrywki lub wieczka (ang. *lid* lub *flap*). Struktura ta stabilizowana jest przez liczne oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne, co powoduje, że miejsce aktywne jest niedostępne dla środowiska wodnego. Założono, że na granicy faz olej/woda następuje odsunięcie „pokrywki” i udostępnienie substratowi miejsca aktywnego.

Schemat tego zjawiska przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat aktywacji międzyfazowej lipaz

wującej wcześniej z hydrofobowym otoczeniem centrum katalitycznego. Podobne zmiany konformacyjne zaobserwowano podczas określania struktury lipazy trzustkowej [53]. Pomimo, że zmiana konformacji tego enzymu podczas aktywacji jest bardziej złożona niż u lipazy z *Rhizomucor miehei* i nie można jej opisać jako poruszenie pojedynczej α -helisowej pętli, to efekt działań jest taki sam. W obu przypadkach przemieszczenie „pokrywki” otwiera miejsce aktywne i tworzy się duża hydrofobowa powierzchnia. Prawdopodobnie obszar ten bierze udział w adsorpcji białek enzymatycznych na granicy faz.

Hiperaktywacja lipaz

W oparciu o zjawisko aktywacji międzyfazowej podjęto szereg prób selektywnej adsorpcji lipaz na hydrofobowych nośnikach. Założono, że enzymy lipolityczne katalizując reakcje w systemach wodnych uznają hydrofobowe powierzchnie nośników za ich naturalne substraty. Pozwala to unieruchomić biokatalizatory w tzw. otwartej, aktywnej formie (ang. „open state”). Pionierami w tej

Przeprowadzone badania krystalograficzne nad lipazą z *Rhizomucor miehei*, której miejsce aktywne związane kowalencyjnie z inhibitorem, potwierdziły przemieszczanie się „pokrywki” podczas aktywacji [10]. Konformacyjną zmianę „wieczka” opisano jako proste i szybką przesunięcie miejsca aktywnego oraz rozwinięcie hydrofobowej powierzchni oddziały-

dziedzinie byli wspomniani wcześniej Sarda i Desnuelle [46], którzy opisali 500-krotny wzrost aktywności lipazy z trzustki wieprzowej w obecności hydrofobowo powleczonego szkła. Palomo i wsp. [39] do adsorpcji międzyfazowej lipaz z *Candida antarctica* (frakcja B), *Mucor miehei* oraz *Candida rugosa* użyli handlowo dostępnego nośnika – Sepabeads. Aktywność i stabilność immobilizowanych preparatów tych lipaz były porównywane z właściwościami odpowiedników natywnych oraz enzymami unieruchamianymi przez wiązanie kowalencyjne na pochodnych agaroz. Lipazy zaadsorbowane na materiale hydrofobowym wykazały duży wzrost aktywności specyficznej (tab.1) względem enzymów nieimmobilizowanych (w zależności od lipazy – 2 do 20-krotny wzrost aktywności). Na szczególną uwagę zasługuje fakt wzmocnienia poprzez taki typ immobilizacji aktywności lipazy *Candida antarctica* B (CALB). Z informacji w literaturze wynika, że enzym ten nie ulega hiperaktywacji międzyfazowej. Przyczyną może być brak typowego „wieczka”. Lipaza CALB posiada płytką szczelinę, której ściany pokryte są hydrofobowymi aminokwasami ograniczającymi dostęp do miejsca aktywnego [8].

Tabela 1. Przykłady hiperaktywacji lipaz wywołanej przez adsorpcję na nośniku

Lipaza	Nośnik	Wynik immobilizacji *	Literatura
<i>Mucor miehei</i>	oktadecyl-Sepabeads	20-krotny wzrost aktywności	[39]
<i>Candida rugosa</i>		4-krotny wzrost aktywności; wzrost termoodporności (100% aktywności po 100 godzinach inkubacji w 45°C)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	oktadecyl-Sepabeads; agaroz z grupami oktylowymi (4BCL)	7-krotny wzrost aktywności; wzrost nadmiaru enancjomerów z E=7 do E=80	[17]
<i>Rhizopus oryzae</i>	DIAION CRBO2	3,3-krotny wzrost aktywności specyficznej; czas utraty 50% aktywności – 28h (natywny – 10h)	[49]
<i>Mucor miehei</i>	Indion 850	wzrost aktywności – 143%; 12 cykli reakcyjnych bez obniżenia aktywności	[18]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Celite 545	6-7-krotny wzrost aktywności estryfikacyjnej	[21]
<i>Humicola lanuginosa</i>	Accurel EP-100	wzrost aktywności specyficznej 40 razy	[40]
<i>Candida rugosa</i>	EDTA-Na ₂	wzrost aktywności transestryfikacyjnej w heksanie: 463%	[41]
<i>Candida sp.</i>		2700%	
<i>Pseudomonas sp.</i>		1215%	

* względem lipaz nieimmobilizowanych

Po unieruchomieniu wzmocniona została odporność katalizatorów na działanie wysokiej temperatury i rozpuszczalników organicznych, np. lipaza z *Candida antarctica* B zachowała 100% wyjściowej aktywności po długiej inkubacji (200 godzin) w 50% dioksanie. Pomimo, że enzymy te były unieruchomione na zasadzie prostej fizycznej adsorpcji, to charakteryzowały się większą stabilnością niż ich odpowiedniki związane kowalencyjnie z nośnikiem. Silna adsorpcja lipaz na „Sepabeads” pozwala na wykorzystanie tych preparatów w bardziej drastycznych warunkach procesowych, np. przy wyższych stężeniach rozpuszczalników organicznych, które mogą być niezbędne do rozpuszczenia hydrofobowych substratów. Z punktu widzenia kosztów procesu przemysłowego, obok silnego wiązania enzymu z nośnikiem, ważna jest także możliwość desorpcji katalizatora po jego inaktywacji i ponowne użycie nośnika. W opisanych badaniach możliwa była całkowita regeneracja nośnika i ponowne wykorzystanie go do wiązania nowej porcji enzymu. Nie zaobserwowano znaczących różnic w wydajności obsadzania białkiem enzymatycznym w porównaniu z pierwszą immobilizacją.

Nośnik Sepabeads oraz agarozę z grupami oktylowymi wykorzystano także do hiperaktywacji lipazy *Pseudomonas fluorescens* [17]. W pracy tej postawiono hipotezę, że różne procedury immobilizacji, angażujące inne obszary białka enzymatycznego lub powodujące odmienny stopień usztywnienia enzymu, mogą przesunąć w różny sposób równowagę pomiędzy otwartą – aktywną a zamkniętą – nieaktywną strukturą cząsteczki lipazy. Hipoteza została potwierdzona, ponieważ uzyskano pochodne o różnej aktywności i selektywności w środowisku wodnym. Enzym immobilizowany przez wiązanie kowalencyjne wykazywał aktywność i enancjoselektywność zbliżoną do lipazy natywnej. W systemach z katalizatorem zaadsorbowanym na hydrofobowych nośnikach stwierdzono wzrost aktywności (średnio 7-krotny w porównaniu z wolną lipazą) oraz enancjoselektywność (uzyskano 99% izomeru *R* estru etylowego kwasu 2-hydroksy-4-fenylbutanowego).

Innym przykładem wzrostu aktywności lipazy spowodowanej immobilizacją w konformacji „otwarte wieczko” są badania dotyczące adsorpcji na makroporowatej żywicy CRBO2 [49]. Efekt hiperaktywacji enzymu został wzmocniony przez działanie na lipazę w roztworze wodnym izopropanolem. Lipaza była unieruchamiana zaraz po kontakcie z rozpuszczalnikiem organicznym. Ta podwójna modyfikacja katalizatora, tj. przez izopropanol i immobilizację poprawiła aktywność i stabilność lipazy bardziej niż każdy z tych czynników zastosowany oddzielnie. Po zbadaniu zmian konformacji wszystkich testowanych lipaz dichroizmem kołowym stwierdzono, że aktywacja związana jest ze zmianami w II i III- rzędowej strukturze białek enzymatycznych. Obecność izopropanolu obniżyła polarność mikrośrodowiska lipaz, co zaowocowało wzrostem zawartości α -helis. Na powierzchnię enzymu zostały „wystawione” bardziej hydrofobowe reszty aminokwasowe (Trp, Tyr, Phe), co mogło doprowadzić do przesunięcia „wieczka”, czyli elementu niezbędnego do aktywacji. Inni autorzy także obserwowali wzrost ilości α -helis podczas przesunięcia „pokrywki” chroniącej miejsce aktywne lipaz [18, 21, 37].

Antczak i in. [3] badając widma różnicowe UV lipazy *Mucor circinelloides* rozpuszczonej w toluenie, postawili hipotezę, że zmiany aktywności enzymu związane są z oddziaływaniem reszty indolowej Trp znajdującej się na zewnątrz

„wieczka” z obecnymi w środowisku reakcji substancjami regulującymi (aktywatory i inhibitory syntezy estrów). Wydaje się, że duże powinowactwo tryptofanu do wiązań estrowych (grup karbonylowych) jest czynnikiem odpowiedzialnym za odsłanianie centrum katalitycznego lipaz.

Wyjątkowe powinowactwo lipaz do materiałów hydrofobowych, oprócz silnej aktywacji po immobilizacji, przynosi także dodatkowe korzyści. Stwierdzono w wielu przypadkach [6, 16, 31, 39, 45], że w zanieczyszczonych preparatach lub ekstraktach białkowych, w układach o niskiej sile jonowej, promowana jest wysoce selektywna adsorpcja lipaz. Pozwala to w dużym stopniu na oczyszczenie biokatalizatora.

Podsumowując zagadnienie immobilizacji lipaz poprzez adsorpcję na nośnikach o hydrofobowej powierzchni można stwierdzić, że technika ta pozwala na:

- dokonanie silnej hiperaktywacji większości lipaz,
- oczyszczenie preparatów enzymatycznych poprzez selektywną adsorpcję lipaz,
- poprawę enancjoselektywności,
- odwracalną immobilizację umożliwiającą odzyskanie drogich nośników po inaktywacji unieruchomionego białka enzymatycznego.

NOŚNIKI STOSOWANE DO ADSORPCJI LIPAZ

Dobór nośnika i procedura wiązania enzymu posiada zasadnicze znaczenie dla jakości produktu finalnego. Ze względu na popularność tej techniki immobilizacji, do próby adsorpcji lipaz wykorzystano szerokie spektrum nośników. Duże zainteresowanie budzą tanie, naturalne adsorbenty nieorganiczne, takie jak bentonit [55], pałgorskit, sepiolit, montmorillonit [13], czy też kaolin [25, 42]. Porównując testowane gliny [13] stwierdzono, że lipazy immobilizowane na materiałach włóknistych (pałgorskit i sepiolit) wykazywały wyższą aktywność hydrolityczną niż zaadsorbowane na krzemianach warstwowych (montmorillonit). Prawdopodobnie miało to związek z lepszym dopasowaniem geometrycznym włóknistych nośników do enzymu. Ponadto krzemiany te są bardziej odpowiednie do unieruchamiania białek niskocząsteczkowych, jak np. lipaza *Rhizomucor miehei*, niż tych o większej masie cząsteczkowej (lipaza z *Candida cylindracea* o masie ok. 60 kDa nie adsorbowała się w całości).

Ciekawe perspektywy w zakresie immobilizacji enzymów pojawiły się wraz z opracowaniem w 1992 roku przez naukowców Mobil Oil i Toyota nowego rodzaju sit molekularnych. Struktura tych materiałów była amorficzna, a rozmiar porów większy niż 2 nm, a więc uzyskano zasięg sit mezoporowatych. Zasadniczym elementem syntezy jest organizowanie się prekursora nieorganicznego wokół micel cylindrycznych powstałych w roztworze wodnym użytych surfaktantów. Wykazują one bardzo wąski zakres dystrybucji porów, co do tej pory obserwowano niemal wyłącznie w krystalicznych sitach molekularnych. W ich skład wchodziła wyłącznie krzemionka. Nową grupę materiałów nazwano M41S [27]. Nośniki należące do tej rodziny (MCM-41 i MCM-36) wykorzystano do fizycznej adsorpcji lipaz [15, 32]. Lipazę trzustki wieprzowej wbudowano do kanałów MCM-41, ale obserwowano wymywanie białka enzymatycznego z porów nośnika [32]. W związku z tym wejścia kanałów zostały zwężone przez wiązanie ko-

walencyjne winylotrimetoksyilanu. Enzym został immobilizowany w „mezoporowatym reaktorze”, gdzie pory uzyskały oryginalny kształt: wąskie „szyjki” i szerokie „ciała” (ang. *ink bottle*). Działanie to zapobiegło wymywaniu enzymu z nośnika nie ograniczając dyfuzji substratów i produktów.

Wśród nośników nieorganicznych stosowanych do adsorpcji lipaz należy wspomnieć także o ziemi okrzemkowej [26, 41, 21], fosforanie cyrkonu [7] oraz węglanie wapnia [44]. Sproszkowany CaCO₃ użyty w doświadczeniu miał bardzo drobne cząstki (57% cząstek o średnicy < 1 μm), co dawało dużą powierzchnię (32000 cm²/g) dostępną do immobilizacji lipazy [44]. Węglan, w reakcji glicerolizy estrów etylowych kwasu DHA pełnił podwójną rolę – nośnika i surfaktanta. Promował tworzenie się emulsji stabilizując krople substratu poprzez ich adsorpcję na granicy faz oraz równocześnie transportował enzym do powierzchni substratu. Szybkość reakcji przy użyciu enzymu unieruchomionego była 5 razy wyższa niż w układzie z lipazą niezwiązaną. Pewnym ograniczeniem tego systemu w użyciu przemysłowym jest trudna separacja produktów z mieszaniny reakcyjnej.

Zdecydowanie najliczniejszą grupą nośników stosowanych do adsorpcji lipaz są nośniki z polimerów syntetycznych. O ich popularności w dużej mierze zdecydowała dostępność na rynku, niski koszt oraz walory procesowe. Do adsorpcji lipaz najczęściej stosowano złoża akrylowe [9, 17, 35, 38, 39], winylowe [18], polihydroksyalkilometakrylany [5, 9], polistyren [18, 23, 34, 49] i polipropylen [1, 2, 45, 51]. W tabeli 2 dokonano przeglądu nośników handlowych oraz ich producentów.

Nośniki organiczne pochodzenia naturalnego rzadko stosowane są jako „czyste” polimery naturalne, lecz najczęściej w połączeniu z materiałami syntetycznymi. Ze względu na specyfikę enzymów lipolitycznych wymagane jest nadanie adsorbentom naturalnym pewnego stopnia hydrofobowości np. przez sprzężenie ich z grupami alkilowymi. Wśród nośników organicznych pochodzenia naturalne-

go dominują matryce bazujące na polisacharydach. Przykładami są jonowymienne sieciowane dekstrany [31], agarozę [6, 17, 35, 38, 39] oraz pochodne celulozy [12]. Nośniki te można zaliczyć do grupy nośników hybrydowych, gdzie umieścimy także materiały powstałe z połączenia membran polipropylenowych i polipeptydów [14] oraz funkcjonalizowaną krzemionkę [8, 21]. Ciekawym przykładem jest nośnik ze zdyspergowanego powietrza (CGAs – ang. *Colloidal Gas Aphrons*) [36]. CGAs to gazowe mikropercherzyki stabilizowane cząsteczkami surfaktanta.

Tabela 2. Nośniki handlowe stosowane do adsorpcji lipaz

Charakter chemiczny nośnika	Nazwa handlowa	Producent	Literatura
epoksydowa matryca akrylowa z grupami oktadecylowymi	octadecyl-Sepabeads	Mitsubishi Chem. Corp.	[17,35,39]
jonowymienna pochodna agarozy	octyl-Sepharose 4BCL	Pharmacia Biotech	[6,17,35,38,39]
polistyren z grupą sacharydową	DIAION CRBO2	Mitsubishi Chem. Corp.	[49]
żywica jonowymienna styren – diwinylobenzen	Indion 850, Indion FFIP, Indion 130, Indion 225H+	Ion Exchange Limited	[18]
styren – diwinylobenzen	Duolite A368 Duolite A568, A562	Diamond Shamrock; Rohm and Haas	[18,23]
polipropylen	Accurel MP1004 Accurel EP-100	Membrana GmbH Accurel Systems; Enka AG; Akzo Nobel Faster	[2,40,45]
polietylen	Accurel EP-400	Akzo Nobel	[34]
żywica jonowymienna styren – diwinylobenzen	Amberlite A-568; IR120; IRC50	Rohm and Haas	[35]
żywica jonowymienna – sieciowany dekstran z grupami sulfopropylowymi	SP-Sephadex C-50	Pharmacia Biotech	[31]
polipropylen / krzemionka	45SAA	QDM Laboratories, Lisburn	[2]
ziemia okrzemkowa	Celite 545 Celite 535	Bayer AG; J.T. Baker Wako Chemical Co.; Johns-Manville Corp.; Fluka Chemika-Biochemika	[21,26,30]

LIPOZYME RM IM I NOVOZYM 435 – UŻYTECZNE NARZĘDZIA W CHEMII LIPIDÓW

Na rynku dostępnych jest cały szereg oczyszczonych lipaz pochodzenia mikrobiologicznego, zarówno w postaci liofilizowanej, jak i unieruchomionej na rozmaitych nośnikach. Producenci tych preparatów to m.in. Amano, Novozymes (dawniej Novo Nordisk A/S), Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Sigma, Genzyme, Genecor, Roche Molecular Biochemicals. Bogata oferta handlowa w tej dziedzinie stwarza możliwość dokładnego wyboru preparatu w zależności od założeń projektowych określonego procesu doświadczalnego lub produkcyjnego.

Do najczęściej stosowanych w skali laboratoryjnej i przemysłowej należą immobilizowane lipazy z *Rhizomucor miehei* (preparat Lipozyme RM IM firmy Novozymes) oraz frakcja B lipazy z *Candida antarctica* (preparat Novozym 435 – Novozymes).

Preparat Lipozyme RM IM to lipaza unieruchomiona przez adsorpcję na makroporowatej żywicy anionowymiennej typu fenolowego. Charakteryzuje się szeroką specyficznością substratową. Może katalizować syntezę estrów z różnorodnych kwasów karboksylowych (nasyconych, nienasyconych, liniowych i rozgałęzionych) oraz alkoholi o różnej rzędowości, lub z innych grup funkcyjnych (aminowa, cyjankowa, eterowa) [33]. Preparat ten działa efektywnie zarówno w systemach wodnych, jak i podczas reakcji prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych [22, 24, 33]. Według informacji producenta lipaza ta wykazuje specyficzność w stosunku do wiązań estrowych w pozycjach sn-1, 3 cząsteczek triacylogliceroli. Fakt ten został potwierdzony w wielu badaniach [22, 28, 29, 52]. Biokatalizator ten jest wysoce aktywny i stabilny w temperaturze 60-70°C [24, 28, 29, 33].

Na rynku dostępny jest także preparat Lipozyme TL IM, w którym lipaza z *Thermomyces lanuginosa* immobilizowana jest na granulowanej krzemionce. Jednak produkt nie jest tak powszechnie stosowany jak Lipozyme RM IM.

Novozym 435 to termostabilna lipaza zaadsorbowana na makroporowatej żywicy akrylowej. Jest to hydrolaza triacyloglicerolowa wykazująca równocześnie aktywność esterazy karboksylowej. Ma szeroką specyficzność substratową, tzn. katalizuje reakcje pomiędzy wieloma I i II-rzędowymi alkoholami i kwasami organicznymi. Specyficzność pozytywna preparatu Novozym 435 zależy od warunków reakcji i reagentów. W niektórych reakcjach wykazuje sn-1, 3 specyficzność, a w innych działa jak lipaza niespecyficzna [28, 29, 47]. Biokatalizator jest aktywny w środowiskach niewodnych, o niskiej zawartości wody oraz w obecności rozpuszczalnika organicznego [19, 28, 29, 47].

Preparaty Lipozyme RM IM i Novozym 435 znalazły zastosowanie głównie jako katalizatory reakcji przeestryfikowania i acydolizy. Przeestryfikowanie enzymatyczne może być wykorzystane do otrzymania osnów margarynowych „zero trans”, co jest alternatywą względem tłuszczów uwodornionych. Potencjalne tłuszcze smaźalnicze i osnowy margarynowe uzyskano w wyniku przeestryfikowania np. łożu wołowego olejem rzepakowym [29] lub kwasem laurynowym [28]. W piekarnictwie i wyrobach cukierniczych mogą być użyte triacyloglicerole będące produktem transestryfikacji oliwy z oliwek, uwodornionego oleju rzepakowego i kwasu behenowego [52].

W obecności lipaz z Lipozyme RM IM oraz Novozym 435 zsyntetyzowano wiele strukturyzowanych lipidów o ulepszonych właściwościach żywieniowych i funkcjonalnych [20, 22, 24]. Biokatalizatory te były aktywne także w reakcji otrzymywania emulgatorów monoacyloglicerolowych [11], produkcji biopaliw [19], rozdziale mieszanin racemicznych [54] oraz modyfikacji tłuszczów w warunkach nadkrytycznych [43].

Obecnie w wielu pracach badawczych preparaty Lipozyme RM IM i Novozym 435 stanowią punkt odniesienia w charakterystyce immobilizowanych różnymi metodami lipaz.

PODSUMOWANIE

Adsorpcja lipaz na powierzchni nośnika, obok wiązania kowalencyjnego, jest najpopularniejszą metodą immobilizacji. Szczególnie obiecująca jest technika adsorpcji enzymów lipolitycznych na matrycach o silnie hydrofobowej powierzchni. Immobilizowane w ten sposób lipazy można stosować w środowiskach o wysokiej aktywności wody, przy czym nie obserwuje się, typowej dla innych białek enzymatycznych, desorpcji katalizatora w wodzie. Silne związanie miejsca aktywnego lipazy z powierzchnią nośnika umożliwia także prowadzenie reakcji w obecności rozpuszczalnika organicznego. Medium organiczne nie ma dostępu do centrum aktywnego enzymu, a kształtowanie właściwości lipazy odbywa się przez „inżynierię nośnika” [16].

Selektywna adsorpcja lipaz na specjalnie skonstruowanych nośnikach hydrofobowych jest ciekawą alternatywą dla konwencjonalnych metod badania nowych lipaz. Dzięki procesowi immobilizacji można jednoetapowo zateżyć, oczyścić i aktywować małą ilość enzymu z zanieczyszczonego ekstraktu białkowego. Ponadto, wykorzystanie różnic w szybkości i efektywności adsorpcji różnych izoform lipaz pozwala w prosty sposób rozdzielić bardzo podobne pod względem struktury enzymy, co jest szczególnie trudne przy użyciu tradycyjnych technik chromatograficznych [16].

Dalszy postęp w zakresie immobilizacji lipaz przez adsorpcję na nośnikach o hydrofobowej powierzchni będzie przypuszczalnie polegał na opracowywaniu nowych adsorbentów i otrzymywaniu unieruchomionych biokatalizatorów o programowanych właściwościach.

LITERATURA

- [1] Adamczak M., Bednarski W.: Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles, *Process Biochem.*, 2004, 39, 1347-1361.
- [2] Al-Duri B., Yong Y.P.: Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports, *Biochem. Eng. J.*, 2000, 4, 207-215.
- [3] Antczak T., Graczyk J., Szcześnie – Antczak M., Bielecki S.: Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, 19-20, 287-294.
- [4] Antczak T., Graczyk J.: Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne, *Biotechnologia*, 2002, 2 (57), 130-145.

- [5] Arica M.Y., Kaçar Y., Ergene A., Denizli A.: Reversible immobilization of lipase on phenylalanine containing hydrogel membranes, *Process Biochem.*, 2001, 36, 847-854.
- [6] Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernandez-Lafuente R., Hugueta J., Giusan J.M.: A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 58, 5, 486-493.
- [7] Bellezza F., Cipiciani A., Costantino U.: Esterase activity of biocomposites constituted by lipase adsorbed on layered zirconium phosphate and phosphonates: selective adsorption of different enzyme isoforms, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, 26, 47-56.
- [8] Blanco R.M., Terreros P., Fernandez-Perez M., Otero C., Diaz-Gonzalez G.: Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization, Characterization of the support and the catalysts, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2004, 30, 83-93.
- [9] Bryjak J., Trochimczuk A.W.: Immobilization of lipase and penicillin acylase on hydrophobic acrylic carriers, *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, 39, 4, 573-578.
- [10] Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Hüge – Jensen B., Patkar SA, Thim L.: A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase – inhibitor complex, *Nature*, 1991, 351, 491-494.
- [11] Camacho F., Robles A., Gonzalez P.A., Camacho B., Esteban L., Molina E.: Mechanistic model for the lipase – catalyzed alcoholysis of triacylglycerols, *App. Catal. A: General*, 2006, 301, 2, 158-168.
- [12] Dalla-Vecchia R., Sebrão D., Nascimento M.G., Soldi V.: Carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization, *Process Biochem.*, 2005, 40, 8, 2677-2682.
- [13] de Fuentes I.E., Viseras C.A., Ubiali D., Terreni M., Alcantara A.R.: Different phyllosilicates as supports for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, 11, 657-663.
- [14] Deng H.-T., Xu Z.-K., Liu Z.-M., Wu J., Ye P.: Adsorption immobilization of *Candida rugosa* lipases on polypropylene hollow fiber microfiltration membranes modified by hydrophobic polypeptides, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, 35, 5, 437-443.
- [15] Dumitriu E., Secundo F., Patarin J., Fechete I.: Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, 22, 119-133.
- [16] Fernandez-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernández-Lorente G., Guisán J.M.: Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, 185-197.
- [17] Fernández-Lorente G., Terreni M., Mateo C., Bastida A., Fernandez-Lafuente R., Dalmases P., Hugueta J., Guisán J.M.: Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, 28, 389-396.
- [18] Gandhi N.N., Vijayalakshmi V., Sawant S.B., Joshi J.B.: Immobilization of *Mucor miehei* lipase on ion exchange resins, *Chem. Eng. J.*, 1996, 61, 149-156.
- [19] Hernandez-Martin E., Otero C.: Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM, *Bioresour. Technol.*, 2007, 99, 2, 277-286.
- [20] Hossen M., Hernandez E.: Enzyme – catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2005, 107, 730-736.
- [21] Ivanov A.E., Schneider M.P.: Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1997, 3, 303-309.
- [22] Jennings B.H., Akoh C.C.: Lipase – catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid, *Food Chemistry*, 2001, 72, 273-278.
- [23] Jonzo M.D., Hiol A., Zagol I., Druet D., Comeau L.-C.: Concentrates of DHA from fish oil by selective esterification of cholesterol by immobilized isoforms of lipase from *Candida rugosa*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 27, 443-450.
- [24] Kadam M., Bhowmick D.N.: Lipase – catalyzed modification of black currant oil, *J. Food Lipids*, 2006, 13, 2, 167-176.
- [25] Kamori M., Hori T., Yamashita Y., Hirose Y., Naoshima Y.: Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2000, 9, 269-274.
- [26] Khare S.K., Nakajima M.: Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil, *Food Chemistry*, 2000, 68, 153-157.
- [27] Kowalak S., Stawiński K.: Mezoporowate sita molekularne, otrzymywanie i właściwości, *Wiadomości Chemiczne*, 2000, 54, 9-10, 817-843.
- [28] Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E.: Enzymatic acidolysis of beef tallow with lauric acid, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 2004, LXXXI, 284-289.
- [29] Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E., Bekas W.: Chemical and enzymatic interesterification of a beef tallow and rapeseed oil equal-weight blend, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, 106, 655-664.
- [30] Lee Ch.-H., Parkin K.L.: Effect of Water Activity and Immobilization on Fatty Acid Selectivity for Esterification Reactions Mediated by Lipases, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 75, 2, 219-227.
- [31] Liu Y.-Y., Xu J.-H., Wu H.-Y., Shen D.: Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen, *J. Biotechnol.*, 2004, 110, 209-217.
- [32] Ma H., He J., Evans D.G., Duan X.: Immobilization of lipase in a mesoporous reactor based on MCM-41, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2004, 30, 5-6, 209-217.
- [33] Miller C., Austin H., Posorske L., Gonzalez J.: Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters, *JAOCs*, 1988, 65, 6, 927-931.

- [34] Murray M., Rooney D., Van Neikerk M., Montenegro A., Weatherley L.R.: Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis, *Process Biochem.*, 1997, 32, 6, 479-486.
- [35] Nieto I., Rocchietti S., Ubiali D., Speranza G., Morelli C.F., Fuentes I.E., Alcantara A.R., Terreni M.: Immobilization of different protein fraction from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract, Enzymatic resolution of (*R*, *S*)-2-tetralol, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37, 514-520.
- [36] O'Connell P.J., Varley J.: Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Colloidal Gas Aphrons (CGAs), *Bio-technol. Bioeng.*, 2001, 74, 3, 264-269.
- [37] Otero C., Fernandez – Perez M., Perez – Gil J.: Effect of interactions of micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Candida rugosa*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37, 695-703.
- [38] Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R., Guisán J.M.: Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 31, 775-783.
- [39] Palomo J.M., Muñoz G., Fernández-Lorente G., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisán J.M.: Interfacial adsorption of lipase on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, 19-20, 279-286.
- [40] Persson M., Mladenoska I., Wethje E., Adlercreutz P.: Preparation of lipases for use in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, 31, 6, 833-841.
- [41] Pu W., Li-rong Y., Jian-ping W.: Immobilization of lipase by salts and transesterification activity in hexane, *Biotechnol. Lett.*, 2001, 23, 1429-1433.
- [42] Rahman M.B.A., Tajudin S.M., Hussein M.Z., R.N.Z.R.A. Rahman Salleh A.B., Basri M.: Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification, *Appl. Clay Sci.*, 2005, 29, 2, 111-116.
- [43] Romero M.D., Calvo L., Alba C., Habulin M., Primozic M., Knez Z.: Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide, *J. Supercritical Fluids*, 2005, 33, 1, 77-84.
- [44] Rosu R., Iwasaki Y., Shimizu N., Doisaki N., Yamane T.: Intensification of lipase performance in a transesterification reaction by immobilization on CaCO₃ powder, *J. Biotechnol.*, 1998, 66, 51-59.
- [45] Salis A., Sanjust E., Solinas V., Monduzzi M.: Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2003, 24-25, 75-82.
- [46] Sarda L., Desnuelle P.: Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion, *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 30, 513-521.
- [47] Senanayake S.P.J.N., Shahidi F.: Lipase – catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into bor-
age oil: optimization using surface methodology, *Food Chemistry*, 2002, 77, 115-123.
- [48] Stadler P., Kovac A., Paltauf F.: Understanding lipase action and selectivity, *Croatia Chemica Acta*, 1995, 68, 3, 649-674.
- [49] Talukder Md.M.R., Tamalampudy S., Li Ch.J., Yanglin L., Wu J., Kondo A., Fakuda H.: An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix, *Biochem. Eng. J.*, 2007, 33, 1, 60-65.
- [50] Tarnowska K., Gruczyńska E., Kowalski B.: Immobilizacja kowalencyjna lipaz, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2008, 1, 72-78.
- [51] Trusek – Holownia A., Noworyta A.: Catalytic membrane preparation for enzymatic hydrolysis reaction carried out in the membrane phase contactor, *Desalination*, 2002, 144, 427-432.
- [52] Tynek M., Ledóchowska E.: Structured triacylglycerols containing behenic acid: preparation and properties, *J. Food Lipids*, 2005, 12, 1, 77-89.
- [53] Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C.: Interfacial activation of lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed X-ray crystallography, *Nature*, 1993, 362, 814-820.
- [54] Xu D., Li Z., Ma S.: Novozym-435-catalyzed enzymatic separation of racemic propargylic alcohols, A facile route to optically active terminal aryl propargylic alcohols, *Tetrahedron Lett.*, 2003, 44, 33, 6343-6346.
- [55] Yesiloglu Y.: Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Process Biochem.*, 2005, 40, 6, 2155-2159.

PHYSICAL IMMOBILIZATION OF LIPASES

Part I

IMMOBILIZATION OF LIPASES BY ADSORPTION

SUMMARY

Lipases are one of the important enzymes, which are used in specific organic synthesis, hydrolysis of fats and oils, modification of fats, flavor enhancement in food processing, resolution of racemic mixtures and chemical analyses.

This article contains information concerning the immobilization of lipases by adsorption and characteristic of commercial carriers used for this purpose. Special emphasis is paid to the selective adsorption of lipases on strongly hydrophobic support surfaces.