

Dr hab. inż. Małgorzata KOWALSKA<sup>1</sup>

Mgr inż. Olga JAGIEŁŁO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chemii, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa

<sup>2</sup>Katedra Towaroznawstwa i Nauk o Jakości, Wydział Nauk Ekonomicznych i Prawnych  
Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny w Radomiu

## NOWE TRENDY W REGENERACJI LIPAZ<sup>®</sup>

### New trends in lipase regeneration<sup>®</sup>

**Słowa kluczowe:** enzymy, lipazy, zastosowanie przemysłowe, regeneracja.

*Możliwość przeprowadzania przez enzymy reakcji biotransformacji, spowodowała wprowadzenie ich jako katalizatorów wielu procesów syntezy, w takich obszarach życia jak: przemysł spożywczy, kosmetyczny, farmaceutyczny czy ogólnie chemiczny. Pomimo szeregu zalet, które są przedstawione w poniższym artykule, ciągle istnieje blokada stosowania lipaz w użyciu powszechnym, a mianowicie wysoka cena. Ze względu na nią lipazy stosowane są tylko dla specjalnych potrzeb i zadań. Aby rozwiązać problem wysokiego kosztu enzymów należy doskonalić metody ich odzysku i regeneracji oraz późniejszego zawrócenia do procesu.*

**Celem artykułu jest przedstawienie możliwych sposobów odzysku, oczyszczenia oraz ponownego użycia zregenerowanego enzymu.**

**Key words:** enzyme, lipase, industrial application, regeneration.

*The possibility of biotransformation reactions carried out by the enzymes caused their introduction as catalysts of many synthetic processes in such areas of life as food, cosmetic, pharmaceutical or general chemical industry. Despite of the many advantages that are presented in the following article, there is still a limitation in the use of lipases in a general application. It is a high price. Due to it, lipases are used only for special needs and tasks. To solve the problem of high cost of enzymes, methods for their recovery and regeneration and subsequent return to the process should be improved.*

**The aim of the article is to present the possible ways of recovery, purification and reuse of the regenerated enzyme.**

## WPROWADZENIE

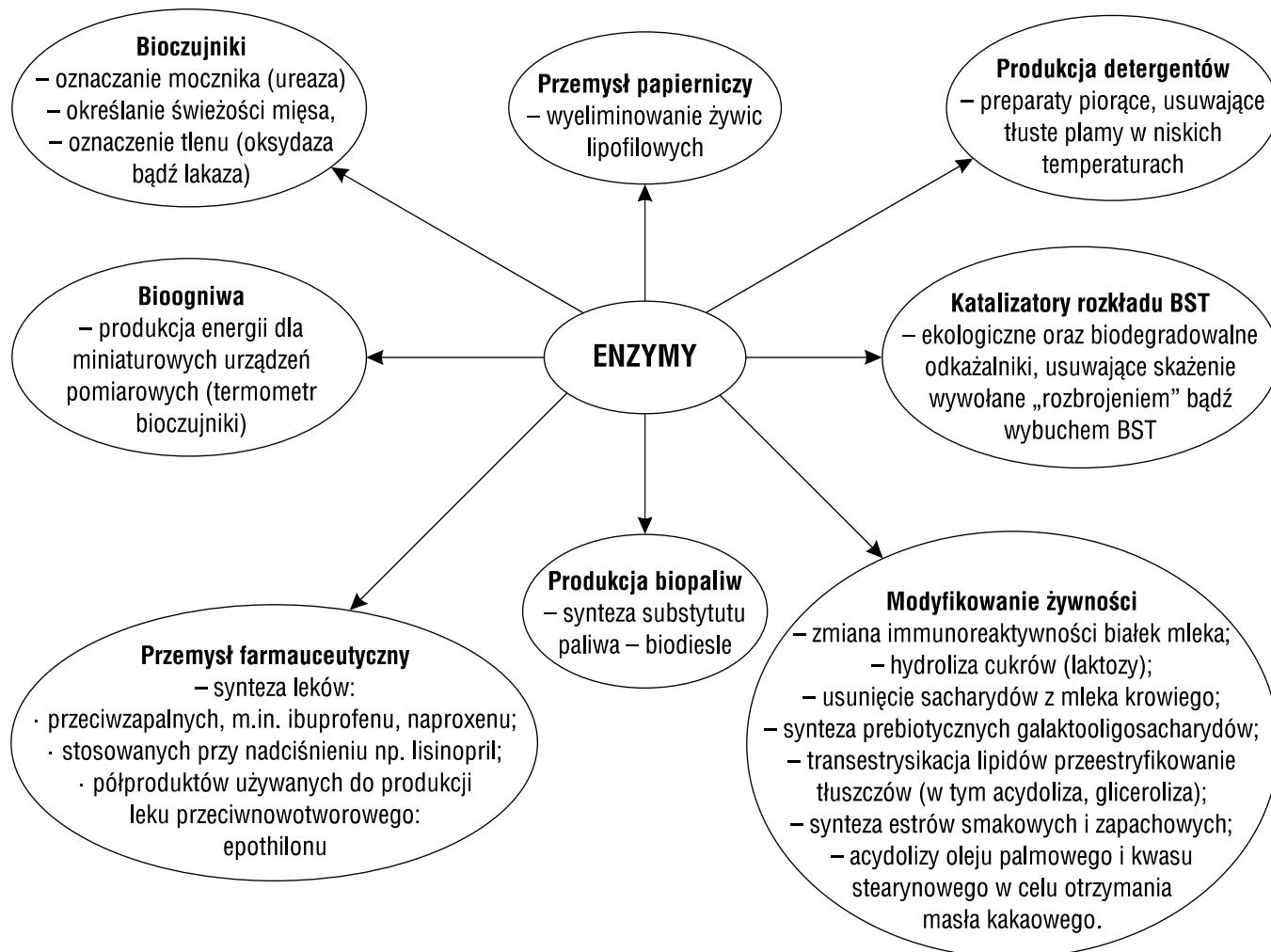
Obecnie wiele uwagi skupia się na realizacji procesów technologicznych które są prowadzone w sposób zrównoważony, czyli taki który jest bezpieczny dla życia i środowiska. Enzymy umożliwiają przeprowadzenie procesów w opisany powyżej sposób. Enzymy to inaczej naturalne biokatalizatory procesów zachodzących w organizmach żywych, naturalne aktywatory czy po prostu biocząsteczki. Dzięki swoim właściwościom (m. in. biodegradacji, wielokrotnemu użyciu oraz wykorzystaniu niewielkich ilości preparatu w reakcji) biokatalizatory stanowią podstawę zrównoważonego rozwoju w przemyśle.

Procesy katalizowane enzymami następują w łagodnych warunkach środowiskowych, co jest niezwykłą zaletą podczas modyfikacji np. składników odżywczych. Dodatkowym atutem jest to, iż proces transformacji przebiega bez zniszczenia pożądaných składników odżywczych [1,8,21]. Enzymy charakteryzują się ponadto wysoką specyficznością oraz selektywnością przez co ich wykorzystanie z każdym rokiem rośnie. Praktycznie jako katalizatory są wykorzystywane w wielu różnych dziedzinach życia codziennego, nauki oraz przemysłu (rysunek 1).

Biokatalizatory jak wspomniano to substancje biodegradowalne oraz kompatybilne ze środowiskiem. Niestety, nie rozwiązaniem do tej pory problemem jest ich dość wysoka cena. Jedną z możliwości obniżenia kosztów stosowania enzymów jest regeneracja i powtórne zawrócenie do procesu. Dzięki takiemu podejściu zredukowana zostaje także ilość odpadów. Poza tym szerokie wykorzystanie enzymów niesie za sobą jeszcze jedną, dodatkową korzyść a mianowicie możliwość wyeliminowania i zastąpienia katalizatorów chemicznych.

## ZASTOSOWANIE IMMOBILIZACJI DLA LIPAZ

W celu zmniejszenia rozpuszczalności biokatalizatora w środowisku reakcji, którą katalizuje, stosuje się immobilizację (unieruchomienie) na nośnikach. Dzięki unieruchomieniu biokatalizator można łatwiej oraz szybciej odzyskać ze środowiska reakcji. Możliwa jest także jego regeneracja w celu późniejszego wielokrotnego wykorzystania. Dodatkowo stosowanie immobilizowanych enzymów pozwala na lepszą kontrolę warunków przeprowadzanego procesu [16,23].



**Rys. 1. Wybrane aplikacje enzymów.**

**Fig. 1. Selected enzyme applications.**

**Źródło:** Opracowanie własne na podstawie [2,3,7,10,15,17,19]

**Source:** Study based on [2,3,7,10,15,17,19]

Immobilizację enzymów można prowadzić na wiele sposobów. Najczęściej wykorzystywane metody unieruchomienia lipaz to:

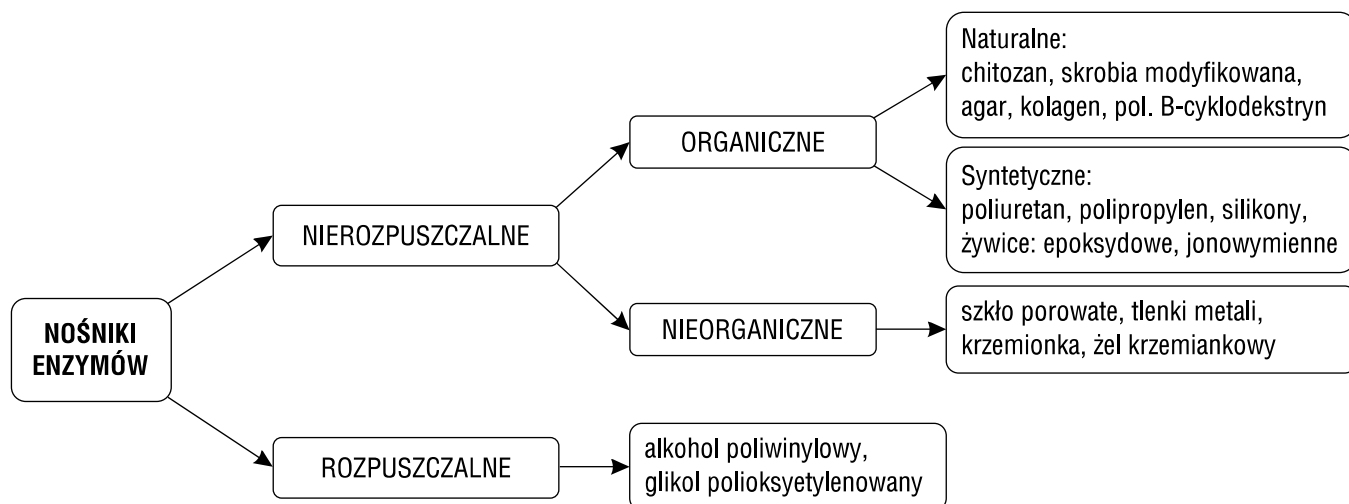
- immobilizacja na powierzchni nośnika – technika ta bazuje na oddziaływaniach kowalencyjnych bądź fizycznych (adsorpcja, adhezja) pomiędzy enzymem a powierzchnią nośnika.
- unieruchomienie wewnątrz nośnika – technika „zamknięcia” enzymu; biokatalizator jest umieszczony w przestrzeni, która izoluje go od środowiska, np. mikrokapsułkowanie [4, 12].

Niewłaściwie dobrane podłoże może spowodować degradację, dezaktywację czy nieefektywne działanie enzymu. Od własności nośnika zależy aktywność a także końcowa cena preparatu immobilizowanego. Jako nośniki biokatalizatora wykorzystywanych jest szereg różnych związków chemicznych. Najczęściej stosowane podłoża zaprezentowano na rysunku 2.

## WYBRANE PROPOZYCJE REGENERACJI LIPAZ I PONOWNE ICH ZAWRÓCENIE DO PROCESU

Znaczenie triacylogliceroli oraz kwasów tłuszczowych w przemyśle spożywczym jest znanym od dawna i wciąż aktualnym zagadnieniem. Lipazy wykorzystuje się do modyfikacji triacylogliceroli ze względu na ich regispecyficzność a tym samym możliwości otrzymania różnorodnych tłuszczów strukturyzowanych (począwszy od triacylogliceroli odpowiadających triacyloglicerolom mleka matki po triacyloglicerole dedykowane osobom z dysfunkcjami przewodu pokarmowego).

Lipazy wykorzystuje się jako katalizatory do modyfikacji tłuszczów przede wszystkim w procesach przeestryfikowania kierowanego bądź niekierowanego [4,12]. Przeestryfikowanie staje się szansą otrzymania tłuszczów bezpiecznych, wolnych od izomerów trans, jest więc procesem konkurencyjnym dla uwodornienia. Regeneracja lipaz a następnie zawrócenie ich do procesu pozwoliłoby na obniżenie kosztów i zdecydowane poszerzenie gamy nowych i bezpiecznych produktów tłuszczowych.



Rys. 2. Wybrane nośniki enzymów.

Fig. 2. Selected enzyme carriers.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [12,16, 23]

Source: Study based on [12,16, 23]

Do regeneracji lipaz (wyodrębnionych z reakcji) można wykorzystywać alkohole o 3 lub większej ilości atomów węgla. Chen i Wu wykazali, iż alkohole: 2-butanol oraz tetra-butanol (w mieszaninie), wykorzystane do obróbki immersyjnej enzymu mogą regenerować immobilizowany biokatalizator. Przykładem zastosowania tej metody jest regeneracja niespecyficznego lipazy Novozym 435, która przed wprowadzeniem do syntezy została „przemyta” metanolem a następnie mieszaniną enancjomerów butanolu. Badania wykonane na Novozymie wykazały, iż jego aktywność wzrosła nawet 10-ciokrotnie w stosunku do preparatu enzymatycznego, który nie został poddany obróbce immersyjnej (nie zastosowano „przemycia” alkoholem) [6, 18].

Zhang i wsp. przeprowadzili proces przeestryfikowania tłuszczu w obecności lipazy immobilizowanej na granulach krzemiankowych. Po ukończeniu procesu przeestryfikowania enzym odzyskano poprzez filtrację. Następnie odzyskany biokatalizator zawrócono do nowej syntezy transestryfikacji. Proces zawrócenia lipazy do środowiska reakcji powtórzono 11-sto krotnie. Badanie otrzymanych produktów końcowych syntezy wykazało, iż zawartość produktów ubocznych uległa zmniejszeniu z 8% do 4% (zawartość diacylogliceroli) oraz z 4,5% do ok. 1% (zawartość wolnych kwasów tłuszczowych) [24].

Selmi i Thomas przedstawili zastosowanie immobilizowanej lipazy w procesie etanolizy oleju słonecznikowego. Syntezę alkoholizy przeprowadzono z użyciem immobilizowanej 1,3 – specyficznej lipazy. Po zakończeniu procesu etanolizy enzym odfiltrowano i ponownie włączono do kolejnej syntezy. Badanie produktów końcowych wykazało, iż podczas trzykrotnego zawrócenia unieruchomionego biokatalizatora, konwersja procesu była wyższa niż konwersja syntezy z użyciem enzymu nieimmobilizowanego. Proces alkoholizy jest niezwykle ważny, ponieważ podczas tej reakcji powstają estry kwasów tłuszczowych, które mogą być zamiennikami biodiesla. W wyniku procesu enzymatycznego otrzymuje się produkt o wysokiej czystości, przyjazny i kompatybilny ze środowiskiem [20].

Odzysk oraz regenerację enzymu z reakcji otrzymywania biopaliwa przedstawili Subhedar i Gogate (2015). W przeprowadzonym przez nich eksperymencie biokatalizator odzyskano ze środowiska reakcji przez odsączenie. Odzyskany enzym przemyto acetonem, a następnie suszono przez 30 minut w temperaturze 40°C. Po procesie suszenia biokatalizator umieszczono w eksykatorze w temperaturze pokojowej. Zregenerowany enzym zastosowano w kolejnych reakcjach syntezy biopaliwa. Badania enzymu wykazały, iż aktywność biokatalizatora uległa zmniejszeniu z ok 95% do 25% (po przeprowadzeniu 7-miu cykli powtórnego użycia) [22].

Inny rodzaj zastosowania preparatu enzymatycznego a następnie jego regeneracji, przedstawili Calero i wsp. (2014). Enzym po reakcji alkoholizy oleju roślinnego został wyodrębniony z mieszaniny poprzez filtrację. Przed ponownym użyciem biokatalizatora, poddano go płukaniu w buforze fosforowym o pH lekko zasadowym (pH=8). Następnie enzym ponownie odfiltrowano. Autorzy potwierdzili, iż po wykonaniu regeneracji biokatalizatora może on zostać ponownie wykorzystany w procesach podobnej syntezy [5]. Opisany proces regeneracji przedstawiono na rysunku 3.

Kutluk i Kapucu (2014) przedstawili w swojej pracy próbę ponownego użycia Lipazy TL. Badanie możliwości wtórnego użycia biokatalizatora przeprowadzono w następujący sposób: sporządzono mieszaninę użytej w syntezie lipazy (5%), wody oraz roztworu metanolu z olejem (stosunek 1/3). Uzyskany roztwór mieszano przez 24 godziny przy 200 obr/min. Immobilizowany enzym odsączono oraz powtórnie wprowadzono do katalizowanej reakcji. Ponowne zastosowanie biokatalizatora (po regeneracji) spowodowało spadek ilości estrów metylowych kwasów tłuszczowych z 95% do 50%, przy czwartej i każdej następnej regeneracji [11].

Lee i wsp. (2013) jako sposób regeneracji biokatalizatora przedstawili „przemycie” immobilizowanej lipazy świeżym krytycznym dwutlenkiem węgla (NcCO<sub>2</sub>). Odzyskany z procesu biokatalizator (poprzez odsączenie), przemyto dwutlenkiem węgla. Następnie enzym poddano procesowi filtracji. Po wykonaniu podanych czynności biokatalizatora użyto do



Rys. 3. Proces regeneracji z zastosowaniem roztworu buforowego.

Fig. 3. Regeneration process with the use of a buffer solution.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [5]

Source: Study based on [5]

kolejnej syntezy. Konwersja produktu po 20-tu powtórnych użyciach biokatalizatora wynosiła 91,1% [13].

Z kolei Liu, Dong i wsp. (2015) odzyskiwali z procesu immobilizowaną lipazę poprzez odfiltrowanie a następnie trzykrotne płukanie biokatalizatora roztworem n-heksanu. Zregenerowaną w dany sposób lipazę odfiltrowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Odfiltrowany enzym suszono jeszcze przez 10 godzin w temperaturze 40°C. Po zakończeniu procesu regeneracji, lipazę wprowadzono ponownie do procesu syntezy strukturyzowanego lipidu 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerolu [14].

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Metody regeneracji enzymów to temat przyszłościowy tzn. biorący pod uwagę zrównoważony rozwój i wszystkie aspekty z tym związane. Przegląd literatury pokazał, że dostępne są metody regeneracji lipaz szczególnie kiedy są one immobilizowane. Do tej pory opracowane metody charakteryzują się dość długim czasem wykonania i wysokim kosztem procesu. Obniżenie kosztów na pewno byłoby motorem do podjęcia prac nad szerszym wykorzystaniem tego rodzaju katalizatorów.

Reasumując, obecne wyzwania jakie stawiane są technikom regeneracji enzymów w każdym sektorze przemysłu to: obniżenie kosztu procesu, ułatwienie wykonania odzysku enzymu o jak najwyższej aktywności i czystości, możliwość szybkiego oraz wielokrotnego użycia lipaz.

W opinii wielu autorów zastosowania zregenerowanego enzymu i udowodnienie jego efektywności może rozwiązać problem wysokiej ceny enzymów i pozwolić na szerokie ich wykorzystanie. Według zgodnej opinii naukowców w ciągu najbliższych lat nastąpi dalszy, gwałtowny wzrost przemysłowego zastosowania lipaz. Dalsze prace nad rozwojem technologii tych enzymów czy metod odzysku i regeneracji są więc jak najbardziej zasadne.

## LITERATURA

- [1] ALEXANDER S., D. FABBRO et al. 2015. "The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Enzymes". British Journal of Pharmacology 172 (24) :5729-5743.
- [2] BANCERZ R. 2017. "Przemysłowe zastosowania lipaz". Postępy Biochemii 63 (4): 335-341.
- [3] BEZBORODOV A. M., N. A. ZAGUSTINA. 2014. "Lipases in catalytic reactions of organic chemistry". Applied Biochemistry and Microbiology 50: 313-337.
- [4] BRYŚ J., M. WIRKOWSKA, B. KOWALSKI. 2006. „Przeestryfikowanie mieszanin tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym w obecności preparatu Novozym 435”. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 2 (47): 28-35.
- [5] CALERO J. et al. 2014. "Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized Rhizomucor miehei lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation". New Biotechnology 31 (6): 596-601.
- [6] CHEN J. W., W. T. WU. 2003. "Regeneration of immobilized Candida antarctica lipase for transesterification". Journal of Bioscience and Bioengineering 95 (5): 466-469.
- [7] CIELECKA E. 2018. „Enzymatyczna modyfikacja składników żywności”. Innowacje, Technika, Nauka. laboratoria.net, artykuły.
- [8] CUESTA S. M., S. A. RAHMAN, N. FURNHAM, J. M. THORNTON. 2015. "The Classification and Evolution of Enzyme Function". Biophysical Journal Biophysical Perspective 109: 1082-1086.
- [9] FERREIRA-DIAS S. et al. 2013. "The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries". Electronic Journal of Biotechnology 16 (3).
- [10] HASAN F., A. A. SHAH, HAMEED et al. 2010. "Enzymes used in detergents: Lipases". African Journal of Biotechnology 9 (31): 4838 – 4844.
- [11] KUTLUK G. B., N. KAPUCU. 2014. "Effects of catalyst loading and reusability on transesterification of waste sunflower oil using immobilized lipase Thermomyces Lanuginosa". JOSUNAS (05):931-935.
- [12] LASOŃ E., J. OGWONSKI. 2010. „Lipaza – charakterystyka, zastosowanie, sposoby immobilizacji” CHEMIK 64 (2):97-102.
- [13] LEE M., D. LEE, J. CHO, S. KIM, P. PARK. 2013. "Enzymatic Biodiesel Synthesis in Semi-Pilot Continuous Process in Near-Critical Carbon Dioxide". Applied Biochemistry and Biotechnology 171 (5): 1118-1127.
- [14] LIU S., X. DONG et al. 2015. "Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content". Ultrasonics Sonochemistry 23: 100-108.

- [15] **MAHARANA A., P. RAY. 2015.** “A novel cold-active lipase from psychrotolerant *Pseudomonas* sp. AKM-L5 showed organic solvent resistant and suitable for detergent formulation”. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic* 120: 173-178.
- [16] **NYARI N. L. D., J. ZENI, C. STEFFENS, M. R. DALLAGO, E. RIGO. 2015.** “Easy and fast method of *Candida antarctica* B lipase immobilization in polyurethane foam”. *Indian Journal Advance Chemical Science* 4 (1):315-322.
- [17] **PANDEY N., K. DHAKAR, R. JAIN. 2016.** “Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*”. *Mycosphere* 7 (10):1533-1545.
- [18] **PEIZHEN L., YANG, Y. TIANKUI. 2009.** “Enhancement and regeneration of activity of lipase for production of diacylglycerols”. *China Oils and Fats* 3.
- [19] **RAY A. 2012.** “Application of lipase in industry”. *Asian Journal of Pharmacy and technology* 2 (2) : 33-37.
- [20] **SELIM B., D. THOMAS. 1998.** “Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent Free Medium”. *JAOCS* 75 (6): 691-695.
- [21] **SMITH J. E. 2009.** *Biotechnology*. Fifth Edition, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne.
- [22] **SUBHEDAR P. B., P. R. GOGATE. 2016.** “Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification”. *Ultrasonics Sonochemistry* 29: 67–75.
- [23] **SYNOWIECKI J., S. WOŁOWSKA. 2007.** „Otrzymanie i niektóre zastosowanie unieruchomionych enzymów”. *Biotechnologia* 77.
- [24] **ZHANG H. et. al. 2001.** “Production of Margarine Fats by Enzymatic Interesterification with Silica-Granulated *Thermomyces lanuginosa* Lipase in a Large-Scale Study”. *JAOCS* 78 (1): 57-64.