

Enzymatyczna modyfikacja lipidów*

Włodzimierz Bednarski, Marek Adamczak

Katedra Biotechnologii Żywności,

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

10-724 Olsztyn, ul. Heweliusza 1

e-mail: wbed@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: lipidy, lipazy, kwasy tłuszczowe

Wstęp

Naturalnie występujące i spożywane tłuszcze oraz oleje nie zawsze spełniają wymagania żywieniowe. Często nie wykazują także pożądanych właściwości fizykochemicznych, np. temperatury topnienia lub krzepnięcia. Modyfikacja kompozycji kwasów tłuszczowych, regio- i stereochemicznej struktury triacylogliceroli decyduje o poprawie ich wartości żywieniowej oraz właściwości fizykochemicznych.

Postęp w zakresie otrzymywania, charakterystyki oraz doskonalenia właściwości lipaz powoduje zwiększone zainteresowanie syntezą modyfikowanych triacylogliceroli o pożądanej wartości żywieniowej, w tym głównie tzw. strukturyzowanych triacylogliceroli (sTAG). Obecnie są one definiowane jako triacyloglicerole o dokładnie określonej kompozycji i położeniu kwasów tłuszczowych zestryfikowanych z glicerolem. W syntezie sTAG stosowane są lipazy o określonych właściwościach biokatalitycznych, np. charakteryzujących się stereoselektywnością, selektywnością pozycyjną oraz selektywnością w stosunku do kwasów tłuszczowych [2, 12, 20, 22].

Enzymatyczne metody modyfikacji lipidów są alternatywą metod chemicznych. Za zastosowaniem enzymatycznej modyfikacji lipidów przemawiają głównie: możliwość otrzymania czystych sTAG w łagodnych warunkach prowadzenia reakcji sprzyjających wysokiej jakości produktów, spełniających kryteria żywności funkcjonalnej [3, 4].

W opracowaniu przedstawiono kierunki i możliwości enzymatycznej modyfikacji lipidów z uwzględnieniem wiedzy o właściwościach lipaz oraz o warunkach sterowania nimi, np. w środowisku o subkrytycznie niskiej zawartości wody.

* Jest to tekst wystąpienia zaprezentowanego na konferencji pt. „Biotechnologia w produkcji żywności” zorganizowanej przez Komitet Nauk o Żywności PAN 26 października 2005 r. w Warszawie.

Charakterystyka lipaz oraz warunków modyfikacji lipidów

Lipazy stosowane w modyfikacji tłuszczów lub olejów wykazują trzy rodzaje selektywności [42]:

- regioselektywność: *sn*-1,3-regioselektywność oraz brak selektywności;
- selektywność w stosunku do kwasów tłuszczowych: długołańcuchowych polienowych kwasów tłuszczowych, nasyconych kwasów tłuszczowych, *cis* *n*-9 nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych;
- selektywność w stosunku do acylogliceroli: mono-, di- lub triacylogliceroli.

Selektywność lipaz zależy od parametrów środowiska reakcji, m.in. polarność rozpuszczalnika lub log P (współczynnika hydrofobowości-hydrofilowości), aktywności wody, nośnika użytego do immobilizacji etc. [48]. Na właściwości lipaz można oddziaływać stosując techniki inżynierii środowiska reakcyjnego, jak również modyfikując je chemicznie lub pokrywając enzymy surfaktantami lub lipidami [2, 49]. W tabeli 1 przedstawiono niektóre informacje dotyczące selektywności lipaz, istotne w syntezie sTAG.

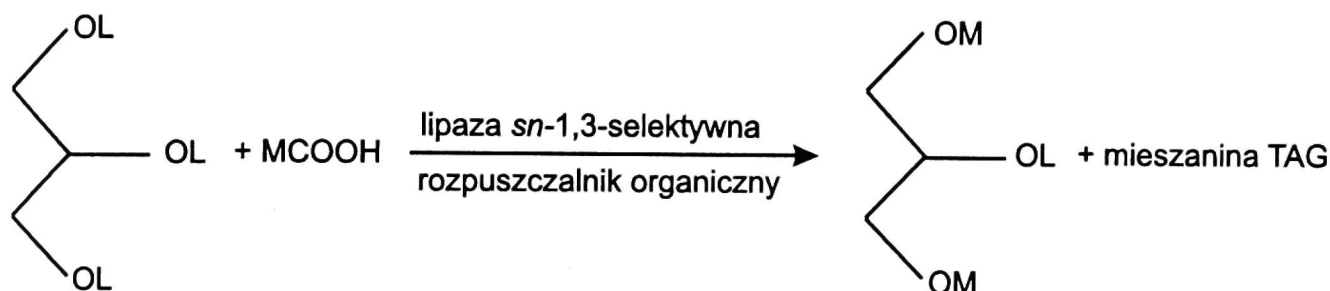
Tabela 1. Charakterystyka selektywności lipaz stosowanych w syntezie sTAG [30]

Źródło lipazy	Selektywność względem kwasów tłuszczowych	Regio-selektywność	Literatura
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >> S	1,3 >> 2	[43]
<i>Rhizomucor miehei</i>	S > M, L	1 > 3 > 2	[14]
Wieprzowa lipaza trzustkowa	S > M, L	1,3	[11]
<i>Humicola lanuginosa</i>	S, M, L	1,3 >2	[11]
<i>Pseudomonas</i> sp.	S, M, L	1,3 >2	[44]
<i>Penicillium camembertii</i>	nieselektywna	2	[52]
<i>Candida antarctica</i>	M, L > S	2	[23]

S – kwasy krótkołańcuchowe, M – kwasy średniołańcuchowe, L – kwasy długołańcuchowe

Możliwe jest także rozróżnianie przez lipazy enancjomerów lipidów. Chandler i in. [14] zastosowali lipazy z *Rhizomucor miehei* i *Rhizopus delemar* do syntezy chiralnych triacylogliceroli. Badanie stereoselektywności immobilizowanej na żywicy jonowymiennej lipazy z *Rhizomucor miehei* za pomocą rezonansu magnetycznego ¹³C wykazało, że lipaza ta jest bardziej selektywna w stosunku do pozycji *sn*-1 niż *sn*-3 w triacyloglicerolach. W optymalnych warunkach (w środowisku *n*-heksanu, temperaturze 60°C, *a_w* = 0,11), ponad 80% syntetyzowanych stereoizomerów zidentyfikowano jako 1-stearynoilo-2-oleinoilo-3-palmitynoilo-*sn*-glicerol. W tych samych warunkach, ale przy użyciu lipazy z *Rhizopus delemar* powstała jedynie mieszanina racemiczna triacylogliceroli.

Enzymatyczna synteza sTAG może być prowadzona generalnie metodami jedno- lub dwustopniowymi. Reakcja jednostopniowa polega na interestryfikacji dwóch triacylogliceroli zawierających ważne kwasy tłuszczowe, przy użyciu *sn*-1,3-regio-selektywnej lipazy albo na prowadzeniu acydolizy triacyloglicerolu z dwoma ekwi-



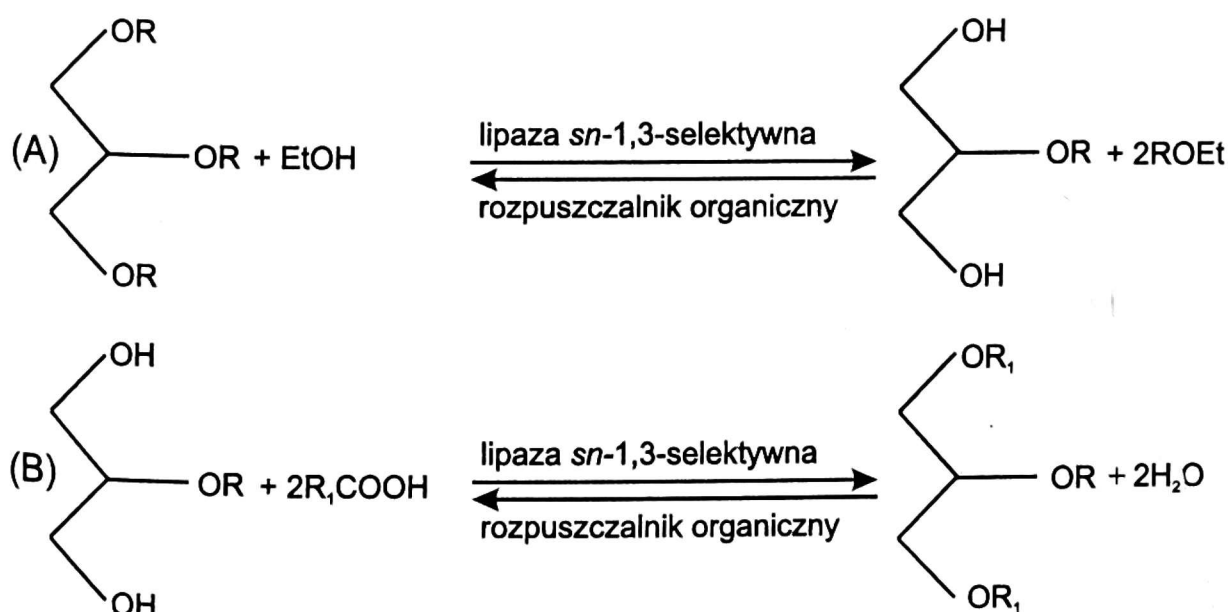
Rysunek 1. Jedno-stopniowa metoda syntezy sTAG (acydloliza). L – długo-, M – średnio-łańcuchowy kwas tłuszczowy

walentami kwasów tłuszczowych lub ich estrów (rys. 1). Wydajność syntezy sTAG w reakcji enzymatycznej inerestryfikacji jest zbliżona do uzyskanej z zastosowaniem katalizatora chemicznego. Główny problem polega na tym, że otrzymane sTAG jest trudno oddzielić od pozostałych triacylogliceroli. Acydloliza triacylogliceroli z kwasami tłuszczowymi prowadzi do otrzymania sTAG z większą wydajnością, gdyż powstaje mniej produktów ubocznych (tab. 2).

W metodzie dwustopniowej czyste triacyloglicerole lub naturalne tłuszcze są w pierwszym etapie poddawane alkoholizacji z użyciem *sn*-1,3-regioselektywnej lipazy. Celem prowadzenia tej reakcji jest uzyskanie czystych 2-monoacylo-*sn*-gliceroli (2-MAG). Czyste 2-MAG należy wydzielić z mieszaniny reakcyjnej w jak najprostszy i najszybszy sposób, np. metodą krystalizacji. Otrzymane 2-MAG są wykorzystywane w drugim etapie do estryfikacji z kwasami tłuszczowymi, celem uzyskania pożądaných sTAG (rys. 2).

W celu uzyskania wysokiej wydajności syntezy (sTAG) wskazane jest przeprowadzenie procesu alkoholizacji zamiast hydrolizacji, ponieważ w ten sposób można uniknąć migracji grup acylowych z pozycji *sn*-2 do *sn*-1 lub *sn*-3.

Rozszerzaniu zakresu możliwości enzymatycznej modyfikacji lipidów sprzyja opanowanie procedur sterowania właściwościami lipaz. Można to uzyskać dobierając warunki środowiska reakcji enzymatycznej. W tym celu stosuje się rozpuszczalniki organiczne, płyny nadkrytyczne, ciecze jonowe itp. [2, 13, 48] Skuteczne w tym



Rysunek 2. Dwu-stopniowa metoda syntezy sTAG. (A) etanoliza, (B) estryfikacja

Tabela 2. Przykłady jedno-stopniowej syntezy sTAG

Źródło lipazy	Reakcja	Warunki reakcji	Wydajność wbudowywania kwasów tłuszczowych lub syntezy sTAG	Literatura
<i>Candida antarctica</i>	transestryfikacja trioleinoilo glicerolu i kaprynianu etylu	55°C w <i>n</i> -heksanie	62,0 mol % sTAG	[21]
<i>Rhizopus delemar</i>	acydoliza oleju z krokosza lub lnianego z kwasem kaprylowym	30°C	45–50 mol % wbudowania kwasu 8:0	[43]
<i>Rhizomucor miehei</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Chromobacterium viscosum</i>	transestryfikacja oleju z orzeszków ziemnych i trikapryloilo glicerolu	40°C w <i>n</i> -heksanie	35 mol % sTAG	[46]
<i>Rhizomucor miehei</i>	acydoliza oleju rzepakowego i kwasu kaprylowego	60°C	65 mol% wbudowania kwasu 10:0	[53]
<i>Rhizomucor miehei</i> <i>Candida antarctica</i>	transestryfikacja trikapryloilo glicerolu i trilinoleinoilo glicerolu	45°C w <i>n</i> -heksanie	53,5 mol % sTAG	[17]
<i>Rhizomucor miehei</i>	acydoliza trioleinoilo glicerolu i kwasu laurynowego	70°C	70 mol % sTAG	[33]
<i>Rhizomucor miehei</i>	transestryfikacja trikapryloilo glicerolu z estrem etylowym EPA	40°C	87,0 mol % sTAG	[19]
<i>Carica papaya</i>	acydoliza tłuszczu drobiowego z kwasem kaprylowym	65°C	23,4 mol % wbudowania kwasu 8:0	[27]
<i>Rhizopus delemar</i>	acydoliza tripalmitynoilo glicerolu z kwasem arachidonowym	40°C	59,0 mol % wbudowania kwasu 20:4	[45]
<i>Rhizopus javanicus</i>	transestryfikacja LCT i MCT	50°C	74 mol% sSTAG	[34]
<i>Rhizopus japonicus</i>	acydoliza tripalmitynoilo glicerolu z kwasem stearynowym	40°C w <i>n</i> -heksanie	Okolo 1 mmol/L sTAG	[7]
<i>Rhizomucor miehei</i>	transestryfikacja EPAT i estru etylowego kwasu kaprylowego	40°C	64,5 mol % sTAG	[23]

LCT – triacyloglicerole zawierające długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, MCT – triacyloglicerole zawierające średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe, EPAT - triacyloglicerole zawierające kwas eikozapentaenowy

zakresie są metody immobilizacji oraz wiązanie lipaz z surfaktantami lub lipidami [49]. Zmianę właściwości lipaz można uzyskać oddziałując na nie mikrofalami, wysokim ciśnieniem, a także dobierając warunki liofilizacji [2] (tab. 3).

Tabela 3. Wybrane przykłady zmiany właściwości lipaz

Źródło enzymu	Metoda	Wynik modyfikacji	Literatura
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Liofilizacja enzymu z cyklodekstranem	1,6–9,8 raza większa aktywność transestryfikacyjna w eterze cyklopentylometylowym	[31]
<i>Candida rugosa</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i>	Liofilizacja enzymu z eterami koronowymi	17 razy zwiększona aktywność transestryfikacyjna w eterze cyklopentylometylowym	[32]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Immobilizacja na CaCO ₃	5-krotnie wyższa aktywność transestryfikacyjna	[41]
<i>Candida rugosa</i>	Bioimprinting kwasem kaprylowym, immobilizacja na Celite	20-krotny wzrost aktywności	[16]
<i>Thermomyces lanuginosa</i> , <i>Rhizomucor miehei</i>	Sieciowanie agregatów enzymów (CLEA)	10-krotny wzrost aktywności	[28]
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Immobilizacja na porowatym polipropylenie, z roztworu soli fosforanowych (200 mM)	770 razy zwiększona aktywność enzymu	[36]

Poprawę enancjoselektywności lipaz można uzyskać stosując funkcjonalną ekspresję izoenzymów lub metody ukierunkowanej ewolucji [13].

Kierunki oraz metody modyfikacji lipidów

W tym zakresie zwraca się uwagę na doskonalenie właściwości żywieniowych, fizykochemicznych i sensorycznych lipidów. Doskonalenie właściwości żywieniowych lipidów uwzględnia:

- zmniejszenie spożycia kwasów tłuszczowych nasyconych oraz nienasyconych izomerów *trans*;
- zwiększenie udziału kwasów tłuszczowych polienowych, przede wszystkim z grupy *n-3* i *n-6* w triacyloglicerolach, np. interestryfikacja tłuszczów i olejów z olejami rybimi, olejami roślinnymi (wiesiołek, ogórecznik, czarna porzeczka, żmijowiec etc.);
- zmniejszenie wartości energetycznej tłuszczów i olejów (zwiększenie udziału krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych, kwasu behenowego);

- synteza diacylogliceroli (zamienniki triacylogliceroli);
- otrzymywanie tłuszczów i olejów funkcjonalnych o poprawionych właściwościach prozdrowotnych, np. triacyloglicerole o podwyższonej zawartości sprzężonych kwasów tłuszczowych;
- otrzymywanie zamienników mleka kobiecego (preparaty mlekozastępcze dla niemowląt);
- modyfikacja fosfolipidów, np. otrzymywanie fosfatydyloseryny.

W doskonaleniu właściwości fizykochemicznych duże znaczenie mają:

- poprawa stabilności oksydacyjnej lipidów, zmiana temperatury krzepnięcia i topnienia, np. otrzymywanie zamienników masła kakaowego, oleju jojoba, otrzymywanie tłuszczów piekarniczych, cukierniczych oraz olejów smażalniczych (zmiana proporcji nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych);
- interstryfikacja enzymatyczna jako alternatywa dla chemicznego uwodornienia tłuszczów (tłuszcze pozbawione izomerów *trans*);
- synteza estrów kwasów tłuszczowych i sacharydów;
- synteza mono- i diacylogliceroli;
- otrzymywanie związków amfifilowych o właściwościach, np. antyoksydacyjnych.

Do znanych kierunków enzymatycznej modyfikacji lipidów zalicza się także syntezę związków smakowo-zapachowych, głównie estrów kwasów tłuszczowych, a także otrzymywanie koncentratów smakowo-zapachowych przypominających organoleptycznie, np. sery [9].

Modyfikacja olejów roślinnych

W modyfikacji składu i właściwości olejów roślinnych stosowane są głównie metody genetyczne. Przykładem zastosowania manipulacji genetycznych w celu doskonalenia zmian w składzie kwasów tłuszczowych olejów roślinnych są wyniki badań firmy Calgene, w których gen kodujący laurynoilo-specyficznej-acyl-ACP tioesterazę z *Umbellularia californica* wprowadzono do *Brassica napus* w celu wcześniejszego przerwania prowadzonego w plastydach enzymatycznego wydłużania łańcuchów kwasów tłuszczowych. Olej z nasion rzepaku transgenicznego charakteryzował się zwiększoną zawartością kwasu laurynowego początkowo do 24%, a w kolejnych generacjach do 40% [15, 26, 50, 51].

Innym przykładem modyfikacji olejów jest ekspresja antysensowej kopii genu desaturazy stearynoilo-ACP u *Brassica napus* i *Brassica rape* częściowo ograniczająca syntezę kwasu oleinowego. W ten sposób u obu gatunków uzyskano zwiększenie zawartości kwasu stearynowego do 40% [26]. Ważnym kierunkiem badawczym jest uzyskanie olejów o zmienionej proporcji kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych. Przykładem może być uzyskanie transformanta rzepaku jarego Canola, którego olej zawierał 83% kwasu oleinowego [29]. Było to możliwe po zablokowaniu aktywności genu A-12 desaturazy. Dalsze prace polegające na skrzyżowaniu otrzy-

many transformantów Canola z mutantami desaturazy oleinowej doprowadziło do zwiększenia zawartości kwasu oleinowego w oleju do 88% oraz zmniejszenia zawartości kwasu linolenowego z 6,5% do 4,2% [29]. Wiadomo, że wprowadzenie antysensu genu desaturazy 18:2 do Canola umożliwia uzyskanie oleju z obniżoną o 7% zawartością kwasu linolowego, a antysensów genów desaturazy Δ -12 i Δ -15 w soi sprzyja zwiększeniu w oleju zawartości kwasu oleinowego z 21% do 80% [29]. Technologiczna wartość oleju sojowego o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego jest większa ze względu na poprawę stabilności oksydacyjnej, która w oleju sojowym z nasion tych transformantów jest czterokrotnie wyższa niż w naturalnym oleju słonecznikowym. Wartość tlenowego indeksu oksydacyjnego OSI (Organ Stability Index) zwiększyła się z 7 godzin do 81 godzin, wobec 18 godzin dla oleju słonecznikowego [26, 29].

Do bardzo wartościowych olejów o znaczeniu prozdrowotnym zalicza się te, które zawierają kwas γ -linolenowy (GLA). W olejach z powszechnie uprawianych roślin oleistych kwas ten nie występuje. Przykładami doskonalenia genetycznego roślin i uzyskania oleju zawierającego GLA jest klonowanie genu Δ -6 desaturazy z cjanobakterii lub z ogórecznika i jego ekspresji w tytoniu. W oleju z liści transgenicznego tytoniu zawartość GLA wynosiła 13%, a kwasu stearynowego – 10% [4].

Doskonalenie składu i jakości olejów roślinnych jest głównym kierunkiem manipulacji genetycznych roślin oleistych. Drugorzędym, choć z punktu widzenia żywieniowego również ważnym, jest ingerencja genetyczna w celu zmiany zawartości i składu tokoferoli i fitosteroli rozpuszczonych w olejach. Ich zawartość w olejach zależy od stopnia dojrzałości nasion. Na przykład względnie krótki okres wegetacji rzepaku w Kanadzie utrudnia osiągnięcie pełnej dojrzałości roślin, które w czasie zbioru pozostają zielone. Skrócenie okresu wegetacji rzepaku jest ważnym zadaniem stawianym inżynierii genetycznej.

O praktycznym wykorzystaniu roślin transgenicznych w produkcji olejów świadczy fakt, że obecnie jest produkowany olej z *B. napus* o nazwie olej laurynowy (*ang.* laurical oil). Zawiera on od 34,5 do 36% kwasu laurynowego oraz od 49 do 84,5% nasyconych kwasów tłuszczowych i od 15 do 47% monoenowych kwasów tłuszczowych [51]. Olej laurynowy charakteryzuje się konsystencją zbliżoną do masła i znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Uwzględniając konsystencję, temperaturę topnienia oraz wyśmienity połysk znajduje on zastosowanie w produkcji cukierniczej, głównie w technologii polew czekoladowych. Olej laurynowy zawiera ponad 35% kwasu laurynowego i jest stosowany także w produkcji serów topionych lub zabielaaczy do kawy [51].

Innym przykładem genetycznego doskonalenia składu lipidów jest otrzymywanie transgenicznych mikroorganizmów, w których, np. oddziałyując na aktywność Δ -5 desaturazy u *Moritirrella aplina*, zmodyfikowano skład wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie $C_{20:4}$. Inaktywując aktywność Δ -12 desaturazy u *Moritirrella aplina* zintensyfikowano syntezę żywieniowo wartościowego kwasu eikozatrienowego [35, 47].

Metodami inżynierii genetycznej doskonalone są również lipazy, głównie mikrobiologiczne, które po rekombinacji genetycznej wykazują korzystniejsze od rodzimych właściwości katalityczne. Przykładem może być rekombinowana lipaza z *Rhizopus nivens* o podwyższonej optymalnej temperaturze działania, którą zastosowano do otrzymywania zamiennika masła kakaowego [2].

Interesującym przykładem modyfikacji olejów roślinnych jest otrzymywanie enzymatycznie restrukturyzowanych triacylogliceroli lipidów złożonych z olejów rybich i roślinnych [3, 4, 37, 38, 39].

Wiadomo, że oleje rybnie są ważnym źródłem polienowych kwasów długołańcuchowych z rodziny $n-3$ (omega 3) szczególnie cenne ze względów żywieniowych są kwasy: *cis*-5,8,11,14,17-eikozapentaenowy (EPA) $C_{20:5}$ oraz *cis*-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy (DHA) $C_{22:6}$. Spożywanie produktów zawierających kwasy tłuszczowe z rodziny $n-3$ zapobiega chorobom serca, obniża poziom triacylogliceroli i cholesterolu, reguluje ciśnienie krwi itp.

Olej rzepakowy jest w porównaniu z olejami rybimi bardziej odporny na zmiany oksydacyjne. Między innymi kompozycja oleju rzepakowego oraz rybiego zapewnia obecność kwasów rodziny $n-3$, a także stabilność oksydacyjną. Z badań Ptasznika i in. [39] wynika, że stosując preparaty lipaz Novozym 435 lub Lipozyme RMIM można otrzymać z mieszaniny olejów rybich i rzepakowego produkty restrukturyzowane o zmienionej (w porównaniu do substratów) strukturze, we wszystkich trzech pozycjach triacylogliceroli (*sn*-1,3 i *sn*-2 TAG).

Innym przykładem enzymatycznej modyfikacji olejów roślinnych jest gliceroliza oleju palmowego z zastosowaniem immobilizowanej lipazy PS (*Pseudomonas* sp.) i otrzymanie produktu końcowego zawierającego ponad 56% monoacylogliceroli [24].

Modyfikacja lipidów zwierzęcych

Zmniejszanie konsumpcji wysokotłuszczowych produktów mleczarskich, w tym głównie masła uzasadnia potrzeby modyfikacji składu i właściwości tłuszczu mlekowego. Jest on mieszaniną około 100 000 różnych triacylogliceroli, których masa cząsteczkowa wynosi od 470 do 890 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, a liczba atomów węgla w cząsteczce mieści się w zakresie od 24 do 54 [6].

Profil kwasów tłuszczowych w tłuszczu mlekowym jest bardzo urozmaicony, w przeważającej części, około 50 mol % stanowią długołańcuchowe, nasycone kwasy tłuszczowe, a 15 mol % to krótko i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe. W ogólnej liczbie około 400 różnych kwasów tłuszczowych obecnych w tłuszczu mlekowym 45% stanowią długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, a wśród nich większość to wysokocholesterolemiczne zestryfikowane w pozycji *sn*-2.

Skład oraz rozmieszczenie średnio- i długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych w cząsteczkach triacylogliceroli tłuszczu mlekowego decyduje o jego właściwościach fizykochemicznych, np. temperaturze topnienia. Do korzystnych

właściwości tłuszczu mlekowego zalicza się zestryfikowanie kwasów tłuszczowych nasyconych, np. C₁₆ w pozycji *sn*-2, co uzasadnia lepsze ich przyswajanie, głównie przez niemowlęta niż z olejów roślinnych, w których odpowiednie kwasy są estryfikowane w pozycji *sn*-1,3 [6].

Postęp w zakresie pozyskiwania i stosowania lipaz sprzyja modyfikacji tłuszczu mlekowego. Obecnie znanych jest kilkanaście dostępnych w handlu produktów z modyfikowanym tłuszczem mlekowym. Wśród nich dominują odżywki dla niemowląt i dzieci oraz preparaty smakowo-zapachowe stosowane w produkcji sosów, krakersów, pieczywa, wyrobów cukierniczych oraz kosmetyków [6].

Korzystne efekty modyfikacji tłuszczu mlekowego uzyskuje się stosując enzymatyczną interestryfikację, polegającą na wymianie i przemieszczaniu grup acylo-owych w triacyloglicerolach tłuszczu mlekowego. Skuteczność tego procesu zależy od właściwości lipaz oraz od warunków środowiska reakcji, np. temperatury. Korzystne efekty uzyskuje się prowadząc reakcję interestryfikacji w rozpuszczalnikach organicznych, np. w izooktanie (tab. 4).

Tabela 4. Porównanie składu triacylogliceroli (mol %) w tłuszczu mlekowym przed i po enzymatycznej interestryfikacji. Opracowano na podstawie pracy Balcao i Malcata [6]

Liczba atomów węgla w cząsteczce triacyloglicerolu	Tłuszcz natywny	Tłuszcz po interestryfikacji z udziałem						
		lipazy z <i>Mucor javanicus</i>	lipazy z <i>Pseudomonas fluorescens</i>					
			bez rozpuszczalnika organicznego			w izooktanie		
		40°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
26	0,1–0,3	0,6	2,6	1,8	2,1	1,7	2,1	2,2
28	0,6–0,8	1,0	2,1	1,7	1,8	2,3	1,9	2,0
30	0,9–1,54	1,9	1,9	2,0	1,9	1,9	2,1	2,1
32	1,9–3,0	3,2	2,8	2,8	3,3	3,3	3,1	3,2
34	4,4–6,2	6,4	4,0	4,3	4,5	4,4	4,5	4,6
36	9,5–12,2	12,1	7,3	7,6	8,2	8,1	7,8	8,0
38	13,1–15,0	14,6	9,8	10,5	10,9	10,7	10,5	10,5
40	11,8–12,1	11,1	8,3	9,3	8,7	8,8	8,3	8,3
42	4,9–7,7	4,1	5,7	6,1	6,0	5,6	6,1	6,2
44	6,2–6,8	6,2	6,5	7,0	7,0	7,1	6,9	7,0
46	6,4–7,5	6,9	10,4	10,5	10,2	10,2	10,4	10,1
48	7,3–8,8	8,4	14,1	13,1	12,4	13,4	13,5	12,5
50	9,8–11,2	11,0	13,7	12,3	12,5	12,9	12,7	12,5
52	10,8	9,2	8,9	8,6	8,5	8,7	8,4	8,7
54	3,8–4,6	3,4	2,1	2,2	1,9	1,8	1,7	2,0

Modyfikowany metodą interestryfikacji tłuszcz mlekowy wykazuje korzystniejsze właściwości żywieniowe. Jego spożywanie sprzyja zmniejszeniu o 12% zawartości cholesterolu we krwi konsumentów [6].

Metodą interestryfikacji tłuszczu mlekowego otrzymuje się zamienniki masła kakaowego, stosowane w produkcji czekolady [6].

W przetwórstwie surowców zwierzęcych powstają odpadowe tłuszcze, np. łój wołowy, tłuszcze drobiowe oraz odzyskiwane ze ścieków tzw. tłuszcze kanałowe. W biotechnologicznym uszlachetnianiu wymienionych tłuszczów stosuje się ich modyfikację z udziałem drobnoustrojów lub preparatów enzymatycznych. Z badań Bednarskiego i in. [8, 10] wynika, że po hodowli wyselekcjonowanych szczepów grzybów (drożdży, grzybów strzępkowych) o aktywności lipolitycznej, w podłożu zawierającym łój wołowy lub tłuszcz drobiowy otrzymuje się biomasę drobnoustrojów oraz pozostające w podłożu lipidy o zmiennym w porównaniu do substratu składzie kwasów tłuszczowych. Stopień wykorzystania łożu wołowego przez grzyby wynosił 22%, a tłuszczu drobiowego 38%. W lipidach pozostających w podłożu zmieniony został udział frakcji mono-, di- i triacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych [8].

W modyfikacji składu i właściwości wymienionych tłuszczów zwierzęcych stosuje się również preparaty lipaz, głównie mikrobiologicznych [1, 5, 30]. Ich powszechne stosowanie utrudniają wysokie ceny. Atrakcyjność ekonomiczną przemysłowego zastosowania enzymatycznej hydrolizy i modyfikacji lipidów można poprawić stosując immobilizowane preparaty lipaz. Sprzyja to także uciążeniu procesu biokatalizy [30]. W ten sposób obniżono w praktyce koszty tego procesu, który jest korzystniejszy od chemicznej modyfikacji lipidów. Na przykład w Japonii zastosowano immobilizowany preparat z *Candida rugosa* w hydrolizie łożu wołowego. Produkuje się w ten sposób kilka tysięcy ton kwasów tłuszczowych rocznie. Znajdują one zastosowanie w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym i kosmetycznym [42].

Korzystny stopień hydrolizy łożu wołowego – 97,1% uzyskali także Antczak i in. [5], stosując w tym celu lipazy z *Mucor racemosus* lub z *Mucor circinelloides*.

Ważnym etapem procesu pozyskiwania produktów hydrolizy lipidów, np. kwasów tłuszczowych, jest ich wydzielenie i oczyszczenie, najlepiej w trakcie procesu hydrolizy. Coraz powszechniej stosuje się w tym celu techniki membranowe.

Postęp w biokatalizie z udziałem lipaz umożliwia enzymatyczną syntezę acylogliceroli o wymaganym składzie i właściwościach.

Adamczak i Bednarski [1] prowadząc z udziałem lipazy z *Chromobacterium viscosum* w środowisku mikrowodnym (1–3% wody) glicerolizę łożu wołowego lub odpadowego tłuszczu drobiowego otrzymali lipidy o zmodyfikowanym udziale mono-, diacylogliceroli oraz wolnych kwasów tłuszczowych. W składzie produktów glicerolizy na uwagę zasługuje wysoki udział monoacylogliceroli około 55%.

W interestryfikacji łożu wołowego MacKenzie i Stevenson [30] zastosowali immobilizowany preparat lipazy Novozym 435 i w ten sposób wzbogacili go w kwas

oleinowy. W otrzymanym produkcie udział kwasów nienasyconych został zwiększony do 60%, a konsystencja łoju zmieniona z zestalonej na płynną. Podobne efekty uzyskali Kowalski i in. [25] po interestryfikacji łoju wołowego z olejem rzepakowym.

Interesujący sposób enzymatycznej modyfikacji smalcu opracowali Yang i in. [48]. W tym celu łączyli go w określonej proporcji z kwasami tłuszczowymi oleju sojowego i prowadzili acydolizę z udziałem *sn*-1,3 specyficznej lipazy z *Rhizomucor miehei*. Skład otrzymanych produktów reakcji acydolizy był zbliżony do składu kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka kobycego.

Innym przykładem enzymatycznej modyfikacji smalcu jest metoda zaproponowana przez Gryglewicza i in. [18]. Polega ona na otrzymaniu specyficznych estrów, np. neopentyloglikolu (NPG) lub trimetylopropylenu (TMP) po reakcji alkoholizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych smalcu. Otrzymane estry charakteryzują się w porównaniu do smalcu wyższą termostabilnością oksydacyjną oraz lepszą smarownością.

Podsumowanie

Przedstawiono kierunki i możliwości enzymatycznej modyfikacji lipidów oraz otrzymywania triacylogliceroli o korzystnej wartości żywieniowej lub pożądanych właściwościach funkcjonalnych.

Zaprezentowano charakterystykę właściwości biokatalitycznych lipaz, np. stereoselektywność, selektywność pozycyjną oraz metody sterowania nimi.

Podano przykłady zastosowania lipaz w modyfikacji olejów roślinnych oraz tłuszczów zwierzęcych, np. tłuszczu mlekowego, łoju wołowego i smalcu. W charakterystyce modyfikacji olejów roślinnych wskazano na metody genetyczne, w tym ekspresję antysensów genów określonych desaturaz, np. w rzepaku lub soi, decydujących o składzie kwasów tłuszczowych w olejach.

Literatura

- [1] Adamczak M., Bednarski W. 1994. Application of enzymatic glycerolysis for production of monoglycerides from waste fats. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 3/4 (1): 129–133.
- [2] Adamczak M., Krishna S.H. 2004. Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 251–264.
- [3] Akoh C.C., Yee L.N. 1997. Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1409–1413.
- [4] Akoh C.C., Moussata C.O. 2001. Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 25–30.

- [5] Antczak T., Krystynowicz A., Galas E. 2000. Enzymatyczna hydroliza tłuszczów odpadowych. *Biotechnologia* 2(49): 120–130.
- [6] Balcao V.M., Malcata F.X. 1998. Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnol. Adv.* 16(2): 309–341.
- [7] Basheer S., Mogi K.-I., Nakajima M. 1995. Development of a novel hollow-fiber membrane reactor for the interesterification of triglycerides and fatty acids using modified lipase. *Proc. Biochem.* 30: 531–536.
- [8] Bednarski W., Kowalewska J., Żegarska Z., Adamczak M. 1993. Growth of three fungi on poultry fat or beef tallow. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9(6): 656–659.
- [9] Bednarski W., Adamczak M. 2003. Modified lipids and fat mimetics. W: Chemical and functional properties of food lipids. Sikorski Z.E., Kołakowska A. (red.), CRC Press, Boca Raton: 309–324.
- [10] Bednarski W., Adamczak M., Kowalewska-Piontas J., Zadernowski R. 1994. Biotechnological methods for the up-grading and modification of animal waste fats. *Acta Biotechnol.* 14(4): 387–393.
- [11] Berger M., Schneider M.P. 1991. Lipases in organic solvents: the fatty acid chain length profile. *Biotechnol. Lett.* 13: 641–645.
- [12] Bornscheuer U.T., Adamczak M., Soumanou M.M. 2003. W: Lipids as constituents of functional foods. Gunstone, FD, (ed.) PJ Barnes and Associates, Bridgwater: 149–182.
- [13] Bornscheuer U.T. 2002. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 543–547.
- [14] Chandler I.C., Quinlan P.T., McNeill G.P. 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1513–1518.
- [15] Del Vecchio A.J. 1996. High laurate canola. How Calgene's program began, where it's headed. *INFORM* 7: 230–235.
- [16] Fishman A., Cogan U. 2003. Bio-imprinting of lipases with fatty acids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22: 193–202.
- [17] Fomuso L.B., Akoh C.C. 1998. Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 405–410.
- [18] Gryglewicz S., Piechocki W. 2003. Preparation of polyol esters based on vegetable and animal fats. *Bioresource Technol.* 87: 35–39.
- [19] Han J.J., Yamane T. 1999. Enhancement of both reaction yield and rate of synthesis of structured triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid under vacuum with water activity control. *Lipids* 34: 989–995.
- [20] Huang Y.-S., Akoh C.C. 1996. Enzymatic synthesis of structured lipids: transesterification triolein and caprylic acid ethyl ester. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 245–250.
- [21] Huang Y.-S., Akoh C.C. 1996. Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using RSM. *J. Food Sci.* 61: 137–141.
- [22] Irimescu R., Yasui M., Iwasaki Y., Shimidzu N., Yamane T. 2000. Enzymatic synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-eicosapentaenoylglycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 501–506.
- [23] Irimescu R., Iwasaki Y., Hou C.T. 2002. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 879–883.
- [24] Kaewthong W., A.H-Kittikun 2004. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 35: 218–222.

- [25] Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E., Bekas W. 2004. Chemical and enzymatic interesterification of beef tallow rapeseed oil equal-weight blend. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 654–655.
- [26] Knutzon D.S., Thompson G.A., Radke S.E., Johnson W.B., Knauf V.C., Kridl J.C. 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(7): 2624–2628.
- [27] Lee K.-T., Foglia T.A. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1027–1034.
- [28] Lopez-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A. 2002. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol. Lett.* 24: 1379–1383.
- [29] MacKenzie S.L. 1999. Chemistry and engineering of edible oils and fats. W: Molecular biotechnology for plant food production O. Paredes-Lopez (red.), Technomic Publishing Co. Inc.: 525–620.
- [30] MacKenzie A.D., Stevenson D.E. 2000. Production of high-oleic acid tallow fractions using lipase-catalyzed directed interesterification, using both batch and continuous processing. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 302–311.
- [31] Mine Y., Zhang L., Fukunaga K., Sugimura Y. 2005. Enhancement of enzyme activity and enantioselectivity by cyclopentyl methyl ether in the transesterification catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase co-lyophilized with cyclodextrins. *Biotechnol. Lett.* 27: 383–388.
- [32] Mine Y., Fukunaga K., Itoh K., Yoshimoto M., Nakao K., Sugimura Y. 2003. Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 441–447.
- [33] Miura S., Ogawa A., Konishi H. 1999. A rapid method for enzymatic synthesis and purification of the structured triacylglycerol, 1,3-dilauroyl-2-oleoyl-glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 927–931.
- [34] Mogi K.-I., Nakajima M., Mukataka S. 2000. Transesterification reaction between medium- and long-chain fatty acid triglycerides using surfactant-modified lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 513–519.
- [35] Ogawa A., Shimizu S. 2002. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 367–375.
- [36] Persson M., Wehtje E., Adlercreutz P. 2002. Factors governing the activity of lyophilized and immobilized lipase preparations in organic solvents. *ChemBiochem* 3: 566–571.
- [37] Ptasznik S., Brzeska M. 2001. Wybrane aspekty enzymatycznej restrukturyzacji triacylogliceroli zawierających długołańcuchowe polienowe kwasy tłuszczowe z grupy *n*-3. *Roczniki Inst. Przem. Mięsnego i Tłuszczowego* 38: 157–170.
- [38] Ptasznik S. 2004. The differences of the structure of triacylglycerols as a result of enzymatic interesterification of fat mixtures with the omega-3 family polygenic fatty acids. *Czech J. Food Sci.* 299(22): 306–309.
- [39] Ptasznik S., Jerzewska M., Ropelewska M. 2004. Enzymatic structurization of rapeseed and fish oil mixtures using biocatalysts Lipozyme RM JM. International Research Conference. The role of Chemistry and Physics in the Development of Agricultural Technologies. Lithuanian University of Agriculture. Kowno. Materiały konferencyjne: 44–45.

- [40] Pu W., Li-rong Y., Jian-ping W. 2001. Immobilization of lipases by salts and the transesterification activity in hexane. *Biotechnol. Lett.* 23: 1429–1433.
- [41] Rosu R., Iwasaki Y., Shimizu N., Doisaki N., Yamane T. 1998. Intensification of lipase performance in a transesterification reaction by immobilization on CaCO₃ powder. *J. Biotechnol.* 66: 51–59.
- [42] Sharma R., Chisty Y., Banerjee U.Ch. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627–662.
- [43] Shimada Y., Sugihara A., Nakano H., Nagao T., Suenaga M., Nakai S., Tomonaga Y. 1997. Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 321–327.
- [44] Shimada Y., Sugihara A., Shibahiraki M., Fujita H., Nakano H., Nagao A., Terai T., Tominaga Y. 1997. Purification of γ -linolenic acid from borage oil by two-step enzymatic method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1465–1470.
- [45] Shimada Y., Nagao A., Hamasaki Y., Akimoto K., Sugihara A., Fujikawa S., Komemushi S., Tominaga Y. 2000. Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 89–93.
- [46] Soumanou M.M. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides containing medium-chain fatty acids in *sn*-1 and *sn*-3-position and a long-chain fatty acid in *sn*-2-position, Ph.D thesis, Stuttgart.
- [47] Takahiro A., Sakuradani E., Ueda T., Shimizu S. 2005. Identification of mutation sites on Δ -5 desaturase genes from *Mortierella alpine* 1 S-4 mutants. *J. Biosci. Bioeng.* 99(34): 296–299.
- [48] Vaysse L., Ly A., Moulin G., Dubreucq E. 2002. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 648–655.
- [49] Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 9: 113–148.
- [50] Voelker T.A., Worrell A.C., Anderson L., Bleibaum J., Fan C., Hawkins D.J., Radke S.E., Davies H.M. 1992. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science* 257(5066): 72–74.
- [51] Voelker T.A., Hayes T.R., Cranmer A.M., Turner J.C., Davies H.M. 1996. Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *Plant J.* 9: 229–241.
- [52] Watanabe Y., Shimada Y., Yamauchi-Sato Y., Kasai M., Yamamoto T., Tsutsumi K., Tominaga Y., Sugihara A. 2002. Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 891–896.
- [53] Xu X., Balchen S., Hoy C.-E., Adler-Nissen J. 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interestrification in a pilot continuous enzyme bed reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1573–1579.
- [54] Xu X. 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 102(4): 287–303.
- [55] Yang T.T., Xu X., He C.Ch., Li L.L. 2003. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chem.* 80: 473–481.

Enzymatic modification of lipids

Key words: lipids, lipases, fatty acids.

Summary

Paper discussed the directions and possibilities concerning enzymatic modification of the lipids as well as obtaining the triacyloglycerols of advantageous nutritive value or desired functional characters. Biocatalytic characteristics of the lipases, such as stereoselectivity, positional selectivity, as well as the methods of their steering, were presented. Some examples of lipases' application to modification of vegetable oils and animal fats, like the milk fat, beef tallow, lard, were given. In characteristics of vegetable oil modification the genetic methods were indicated, including antisense gene expression of particular desaturases, e.g. of the rapeseed or soybean, which determine the fatty acid composition in oils.