

Enzymové premeny triacylglycerolov

SILVIA HURTOVÁ - JAROSLAV ZEMANOVIČ - ŠTEFAN SCHMIDT

Súhrn. V práci prehľadne uvádzame možnosti biomodifikácie jednoduchých lipidov (tukov a olejov) účinkom lipáz. Enzymom katalyzované reakcie transesterifikácie a esterifikácie umožňujú získať vysokohodnotné tuky a oleje s ohľadom na ich výživovú a úžitkovú hodnotu. Takéto tuky so žiadanými fyzikálnymi, chemickými a biologickými vlastnosťami môžu nájsť uplatnenie nielen v potravinárskom, ale aj farmaceutickom a v kozmetickom priemysle. V práci ďalej diskutujeme aj o možnosti využitia týchto lipáz pre enzymovú hydrolyzu tukov s cieľom prípravy špecifických mastných kyselín, resp. parciálnych glycerolov alebo glycerolu.

Zdravý vývin človeka je neodmysliteľne spojený s jeho správnou výživou. Keďže lipidy, popri sacharidoch a bielkovinách, patria medzi základné faktory ľudskej výživy, problematika získania biologicky vysokohodnotných tukových výrobkov, s vopred zvoleným komplexom výsledných vlastností, ostáva stále aktuálnou. V súčasnosti sa pre modifikáciu prírodných tukov a olejov využíva v priemyselnom merítke najmä proces medzimolekulovej preesterifikácie za použitia bázičných katalyzátorov. Popri tejto chemickej ceste, ukazujú sa veľké možnosti a perspektívy priemyslu tukov a olejov v súvislosti s využitím lipáz pre biomodifikáciu lipidov, najmä enzymovou transesterifikáciou prírodných tukov a olejov, za účelom zmeny zloženia ich štruktúr, a tým aj ich fyzikálnych alebo biologických vlastností.

Možnosti ovplyvňovania triacylglycerolových štruktúr prírodných tukov a olejov rastlinného a živočíšneho pôvodu biochemickou cestou, t.j. použitím lipáz, v porovnaní s reakciami katalyzovanými chemickými činidlami,

Ing. Silvia Hurtová, Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Ing. Štefan Schmidt, CSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatin, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

majú niekoľko výhod. Hlavnou výhodou je fakt, že sa touto cestou dá pripraviť široká škála produktov rôzneho zloženia a vlastností, ktorá vyplýva zo špecificity lipázy (pre určitú masťnú kyselinu alebo polohu na molekule acylglycerolu) alebo jej stereošpecificity [1]. Ďalšou výhodou sú mierne reakčné podmienky, z čoho vyplýva menšia spotreba energie a menšie tepelné poškodenie reaktantov a produktov [2].

Popredné miesto, čo sa týka reakcií katalyzovaných lipázou, z hľadiska ich možnej aplikácie v priemysle tukov a olejov, zaujímajú reverzné reakcie hydrolýzy, najmä reakcie transesterifikácie.

I. Reverzné reakcie hydrolýzy - transesterifikácia a esterifikácia

Lipázy (glycerolesterhydrolázy), či už živočíšneho, rastlinného alebo mikrobiálneho pôvodu, pôsobia v heterogénnych systémoch, pretože katalyzujú hydrolýzu esterových väzieb dlhoreťazcových acylglycerolov na fázovom rozhraní olej-voda (vo vode nerozpustná substrátová fáza - vodná fáza s rozpusteným enzýmom) [1]. Katalytické pôsobenie lipáz je reverzibilné. Katalyzujú nielen hydrolytické štiepenie tukov (esterov), ale aj ich syntézu a transesterifikáciu. Priebeh reakcie je ovplyvnený obsahom vody v reakčnom médiu. Transesterifikácia i esterifikácia, ako reverzné reakcie hydrolýzy, prebiehajú prednostne pri nízkom obsahu vody (pod 1%) [3].

Dôležitým faktorom, z hľadiska použitia lipáz na analytické účely, ale i možnej aplikácie v priemyselnom merítku, či už sa jedná o reakcie hydrolýzy, alebo skôr o reakcie transesterifikácie, je ich špecificita (pre polohu alebo určitú masťnú kyselinu v molekule acylglycerolu). V súvislosti s reakciami transesterifikácie, použitím tzv. nešpecifickej lipázy napr. lipázy z *Candida rugosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Humicola lanuginosa* a pod. t.j. lipázy, ktorá nie je špecifická ani pre určitú masťnú kyselinu, ani pre polohu na molekule glycerolu, produkované triacylglyceroly (TAG) sú rovnaké ako tie, získané chemickou preesterifikáciou t.j. acylové skupiny masťných kyselín (MK) sú náhodne distribuované v acylglyceroloch [4], ale za miernejších reakčných podmienok. Záujem sa preto sústreďuje viac na preesterifikáciu jedlých tukov s tzv. sn-1,3-polohovo špecifickou lipázou napr. pankreatická lipáza, lipáza z *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* a pod., pri ktorej acylová migrácia sa obmedzuje len na vonkajšie polohy TAG, a ktorou je možné získať zmesi TAG, ktoré nie je možné pripraviť chemicky [4]. Výhodou tejto reakcie je, že popri miernej-

ších podmienkach, a s tým súvisiacej úspore energie a zníženej tvorbe vedľajších produktov, sa biologicky významná poloha sn-2 (špecifická pre výskyt najmä kyseliny olejovej, linolovej, príp. linolénovej) [5], nemení [6]. Ďalšou výhodou, v porovnaní s alkalickou preesterifikáciou, je možnosť usmerňovania priebehu reakcie a jej ukončenie pri dosiahnutí požadovaného stupňa premeny [6]. Z aplikačného hľadiska má tento typ reakcie význam pre prípravu vysokohodnotných náhradiek kakaového masla z lacnejších surovín, vhodných pre priemysel cukrovínok napr. interesterifikácia palmového oleja s tristearínom alebo acidolýza s kyselinou stearovou (ide o prípravu dominantných TAG štruktúr kakaového masla typu POST a StOST; P-palmitoyl, O-oleoyl, St-stearoyl) [3,4,7]. Použitím lipázy napr. z *Geotrichum candidum* [1] dochádza ku selektívnej výmene nenasýtených mastných kyselín s dvojitou väzbou v polohe 9 v cis konfigurácii v zmesi TAG alebo TAG a MK napr. preesterifikáciou zmesi olivového oleja s kyselinou linolénovou a stearovou použitím imobilizovanej lipázy z *Geotrichum candidum* sa tvoria TAG, ktoré sú obohatené o kyselinu linolénovú na úkor olejovej [4].

Reakcie transesterifikácie, v súvislosti s biomodifikáciou prírodných tukov a olejov, zaujímajú významné miesto, o čom svedčí aj množstvo publikovaných prác venovaných tejto problematike, najmä v poslednej dekáde. Niektorí autori sledovali vplyv rôznych faktorov na priebeh transesterifikácie napr. vplyv nelipidického materiálu [8], polaritu substrátu, aktivity vody a obsah vody na aktivitu enzýmu [9], vplyv fosfolipidov [10], tlmivého roztoku [11], alebo teploty [12]. Niekoľko prác bolo venovaných priebehu transesterifikácie v organických rozpúšťadlách. Procesy katalyzované lipázou, ktoré prebiehajú v organických rozpúšťadlách, majú priemyselný význam, lebo odstraňujú nevýhody biologickej katalýzy v zriedených roztokoch (zvýši sa rozpustnosť tukov a olejov, rovnováha sa posúva v smere reverznej reakcie hydrolýzy t.j. transesterifikácie). Musí sa však zabezpečiť stabilita lipázy napr. ich imobilizáciou alebo modifikáciou. Prítomnosť organických rozpúšťadiel detailne študovali napr. Zaks a Klíbanov [13]. Miller a kol. [14] sledovali kinetiku lipázou katalyzovanej preesterifikácie TAG v cyklohexáne. Osterberg a kol. [15] uskutočnili transesterifikáciu trioleínu s kyselinou stearovou, α -linolénovou a γ -linolénovou a transesterifikáciu TAG obsahujúcich γ -linolénovú kyselinu s kyselinou linolovou za použitia sn-1,3-špecifickej lipázy z *Rhizopus delemar* v systéme tzv. reverzných micel vytvorených PAL a izooktánom (fosfátový tlmivý roztok).

Dôležitým faktorom z hľadiska použitia lipáz ako interesterifikačných katalyzátorov je popri ich aktivite aj stabilita, najmä v prostredí organického rozpúšťadla, ktorú je možné zvýšiť ich imobilizáciou na rôznych nosičoch, aj na úkor určitého zníženia aktivity. Ako najefektívnejšie nosiče sa ukázali Hyflo Supercel (kremičitá zemina) pre imobilizáciu lipázy napr. z *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus sp.* [8], *Pseudomonas fluorescens* [16], ďalej makropórové iónovymenné živice pre lipázu z *Mucor miehei*, komerčne vyrábanú pod názvom Lipozyme [12]. Zaujímavá je aj aplikácia PEG-modifikovanej lipázy pre reakcie esterovej výmeny napr. medzi trilaurínom a trioleínom [17] pre prípravu zmesi s nižšou teplotou topenia.

Počiatkové práce, ktoré sledovali možné aplikácie lipáz v oblasti transesterifikácie sa zameriavali na prípravu produktov podobných kakaovému maslu, čo sa týka ich TAG štruktúry a fyzikálnych vlastností, z lacnejších materiálov. Takéto produkty, ktoré majú veľký význam pre výrobu cukroviniek, farmaceutický i kozmetický priemysel, boli pripravené napr. acidolýzou olivového oleja s kyselinou stearovou pôsobením sn-1,3-špecifickej lipázy z *Rhizopus delemar* [18], alebo s kyselinou palmitovou s využitím Lipozyme (*Mucor miehei*) [19], alebo transesterifikáciou palmového oleja s lipázou z *Aspergillus sp.* [20].

Transesterifikácia rastlinného oleja (napr. slnečnicového) so strednoredúcovými MK umožňuje pripraviť TAG s obsahom acylov strednej dĺžky v polohe sn-1,3 a dlhoredúcové MK v polohe sn-2. Tieto produkty, v prírode sa nevyskytujúce a chemicky ťažko pripraviteľné, môžu nájsť uplatnenie v dietetických výrobkoch [21].

Možnosti aplikácie transesterifikácie sa ukazujú aj ako alternatívny postup rafinačného procesu, zameraného na odstránenie kyseliny linolénovej zo sójového oleja, ktorá znižuje jeho stabilitu voči oxidácii. Znížením obsahu tejto kyseliny pod 3% acidolýzou sójového oleja s pankreatickou lipázou imobilizovanou na Celite (kremičitá zemina), môžeme zlepšiť kvalitu sójového oleja [22].

Popri reakciách transesterifikácie majú významné miesto i reakcie esterifikácie. V závislosti na špecificite lipázy sú tvorené rôzne estery, ako produkty esterifikácie karboxylových skupín a alkoholu (alifatického alebo glycerolu). Esterifikácia, podobne ako transesterifikácia, prebieha v dvojfázovom reakčnom systéme vytvorenom z vo vode nerozpustného substrátu rozpusteného v rozpúšťadlách nemiešateľných s vodou napr. hexán [23] a z vodného roztoku enzýmu. Aby sa dosiahla požadovaná rýchlosť enzymovej reakcie, vyžaduje sa dobrá homogenizácia (zabezpečená miešaním) a

prítomnosť emulgátorov a stabilizátorov na vytvorenie veľkej medzifázovej plochy medzi vo vode nerozpustným substrátom a vodným roztokom enzýmu, kde reakcia prebieha [2]. Keďže tvorba esterov, rovnako ako tvorba produktov transesterifikácie, striktné závisí od obsahu vody (pod 1%, nie však úplne bezvodé prostredie, aby sa lipáza neinaktivovala), reakciou vytvorená voda musí byť z reakčného prostredia odstránená (spontánnym odparením alebo za vákua) [24]. Pri použití organických rozpúšťadiel v reakčnom systéme je opäť nutné zabezpečiť enzým pred denaturáciou imobilizáciou alebo jeho chemickou modifikáciou napr. s PEG. Aplikácia PEG-modifikovanej lipázy napr. z *Pseudomonas fluorescens* bola uvedená pre prípravu lauroylestero v benzéne (z kyseliny stearovej a laurylalkoholu) alebo pre syntézu metylbenzoanov použitím modifikovanej lipázy z *Candida cylindracea* [24].

Enzymová esterifikácia môže prebiehať aj bez prítomnosti rozpúšťadla napr. syntéza esterov z kyseliny olejovej a glycerolu s imobilizovanou lipázou z *Mucor miehei* [25], alebo príprava strednoreťazcových acylglycerolov syntézou s kyselinou dekánovou a glycerolom bez prítomnosti PAL, ktoré sú vhodné do dietetických produktov, alebo ako rozpúšťadlá pre aromatické látky, steroidy, farbivá, vonné látky v kozmetickom a farmaceutickom priemysle a nosiče lipofilných látok a liečív [26].

Reakcie esterifikácie (podobne ako transesterifikácie) katalyzované lipázou je možné využiť pre prípravu monoacylglycerolov (MAG), používaných ako emulgátory v potravinárskom priemysle. Uskutočnením tzv. glycerolýzy za použitia lipáz sa vďaka miernym reakčným podmienkam zníži tvorba nežiadúcich tmavosfarbených vedľajších produktov, čím sa zabezpečí vyššia kvalita produktov, s ohľadom na chuť, vôňu, farbu (v porovnaní s procesom priemyselnej glycerolýzy), za súčasnej úspory energie [27]. Použitím špecifických lipáz napr. z *Penicilium sp.* (Lipase G), ktorá je špecifická pre MAG, je možné dosiahnuť priebeh reakcie požadovaným smerom (v smere tvorby MAG) [2].

Reverzné reakcie hydrolýzy je možné využiť nielen pre prípravu špeciálnych tukov pre rôzne účely, napr. tzv. náhradiek kakaového masla [4,18,20], alebo tukov vhodných pre dietetické účely [21], ale i pre prípravu emulgátorov typu MAG enzymovou glycerolýzou [27,28], tiež aj pri tzv. deacidifikácii tukov a olejov (alternatíva alkalickéj neutralizácie pri rafinácii jedlých tukov) [22, 27], ďalej pre prípravu voskových esterov napr. pre prípravu voskových esterov podobných jojobovému oleju, vhodných pre kozmetický priemysel [2], pre prípravu esterov cukrov a sorbitolu (používaných

podobne ako MAG ako emulgátory v potravinárstve, ale i farmaceutickom a kozmetickom priemysle) [1,7], alebo esterov terpénických alkoholov (mentol, geraniol), používaných ako vonné látky [2] a pod.

II. Hydrolýza (štiepenie) tukov

Priemyselný proces štiepenia tukov za účelom prípravy parciálnych glycerolov, MK a glycerolu prebieha pri pomerne drastických podmienkach (250°C, 6.10⁶ Pa, vodnou parou), pričom sa rozkladajú polynenasýtené MK a vznikajú nežiadúce tmavosfarbené produkty, produkty polymerizácie, ketóny a uhľovodíky, ktoré je nutné destilačne odstrániť. V snahe minimalizovať teplotnú degradáciu a znížiť i spotrebu energie boli uskutočnené práce zamerané na štiepenie tukov enzymaticky, použitím lipáz, za miernych reakčných podmienok [29]. Záujem o použitie lipáz, ako katalyzátorov enzýmového štiepenia tukov, s rozvojom prípravy pomerne lacných extracelulárnych lipáz (komerčne vyrábaných lipáz), neustále narastá. V tejto súvislosti majú najväčší význam najmä neregiošpecifické lipázy (pre úplnú hydrolýzu) [1].

Enzýmová hydrolýza tukov za použitia nešpecifických lipáz napr. z *Candida rugosa* [30], *Pseudomonas sp.* [31], poskytuje alternatívny proces totálnej hydrolýzy tukov pre prípravu MK, ale za miernych podmienok. Pri použití sn-1,3 špecifických lipáz ide o parciálnu hydrolýzu tuku, ktorá môže viesť ku vyšším výťažkom MAG, používaných ako emulgátory [7]. Čiastočná hydrolýza tukov a olejov je vhodná aj pre prípravu špeciálnych MK nielen použitím sn-1,3 špecifických lipáz, ale aj lipáz špecifických pre určité MK napr. z *Geotrichum candidum*, ktorá preferenčne pôsobí na nenasýtené MK s cis dvojitou väzbou v polohe 9, ktoré sú nutrične významné. Parciálnou hydrolýzou surových olejov s sn-1,3 špecifickou lipázou môžeme získať mononenasýtené dlhoreťazcové MK (gadolejová, eruková, nervonová), ktoré sú cenné v oleochemickom priemysle [2].

Zaujímavé možnosti pre využitie lipázou katalyzovaných reakcií, v súvislosti so zvýšením reakčnej rýchlosti hydrolýzy, poskytuje systém tzv. reverzných micel, t.j. vodných roztokov enzýmu solubilizovaných v roztoku lipidu v nepolárnom organickom rozpúšťadle pomocou PAL [14,32,33]. Takéto systémy poskytujú veľkú plochu fázového rozhrania olej-voda, kde lipáza pôsobí [33]. Pri štúdiu dvojfázových systémov sa ako najvhodnejšie

rozpušťaadlo ukázal izooktán [34]. Systémy s reverznými micelami majú niekoľko výhod:

- na vytvorenie veľkého fázového rozhrania stačí málo energie,
- jednoduchá separácia produktov od enzýmu,
- vylúčenie mikrobiálnej kontaminácie a inhibície substrátom alebo produktom.

Biochemická cesta modifikácie prírodných tukov a olejov ukazuje sa ako pomerne perspektívna, o čom svedčí i množstvo publikovaných prác týkajúcich sa uvedenej problematiky. V porovnaní s chemickou cestou premien prírodných tukov a olejov, biotransformačné reakcie katalyzované lipázami prebiehajú za miernejších podmienok, čím sa dosiahne jednak úspora energie, a zároveň sa znižuje aj možnosť tvorby vedľajších produktov, vznikajúcich termickým rozkladom tukových látok. Lipázami (s polohovou špecificitou alebo špecificitou pre určité MK) katalyzované reakcie, najmä preesterifikácie, ale i hydrolytické, umožňujú prípravu takých produktov s takými vlastnosťami, ktoré nie je možné doceliť chemickou cestou. Z hľadiska možnosti aplikácie lipáz i pre priemyselné účely je nutné zabezpečiť dostatočné množstvo dostupných lipáz potrebnej aktivity a stability, cenovo prístupných (zohľadnenie i ekonomického faktora). Za týmto účelom sa v súčasnosti už vyrábajú niektoré lipázy komerčne napr. pankreatická lipáza (Sigma), lipáza z *Mucor miehei* Lipozyme (Novo), *Candida rugosa* (Meito, Sangyo), *Aspergillus niger* (Amano), *Rhizopus delemar* (Amano), *Rhizopus arrhizus* (Sempa), *Chromobacterium viscosum* (Toyo, Jozo), *Pseudomonas fluorescens* (Amano) a pod. [3,35].

Literatúra

1. MACRAE, A.R. - HAMMOND, R.C., Biotechn. Bioeng., 28, 1985, s.199.
2. MUKHERJEE, K.D., Biocatalysis, 3, 1990, s.277.
3. RATLEDGE, C., Microbial Lipids, London, Academic Press 1989, 726s.
4. MACRAE, A.R., Biotechnology for the Oils and Fats, AOCS, 1984, s.298.
5. POSORSKE, L.H. et al., J. Amer. Oil Chem. Soc., 65, 1988, s.922.
6. LUCK, T. - BAUER, W., Fat Sci. Technol., 93, 1991, s.41.
7. BUHLER, M. - WANDREY, C., Fat Sci. Technol., 94, 1992, s.82.
8. WINSDOM, R.A. - DUNNIL, P. - LILLY, M.D., Enzyme Microb. Technol., 6, 198, s.443.
9. GOLDBERG, M. - THOMAS, D. - LAGOY, M.D., Eur. J. Biochem., 190, 1990, s.603.
10. WANG, Z.O. - GORDON, M.G., J. Amer. Oil Chem. Soc., 68, 1991, s.588.
11. McNEIL, G.P. - SHIMIZU, S. - YAMANE, T., J. Amer. Oil Chem. Soc., 68, 1991, s.1.
12. LUCK, T. - BAUER, W., DECHEMA Biotechnology Conference, 3 VCH Verlagsgesellschaft, 1988, s.631.

14. MILLER, D.A. - PRAUSNITZ, J. M. - BLANCH, H.W., *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 1991, s.98.
15. OSTERBERG, E. - BLOMSTROM, A.C. - HOLMBERG, K., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 66, 1989, s.1330.
16. KALO, P. - HUOTARI, H. - ATILA., *Milchwissenschaft*, 45, 1990, s.281.
17. INADA, Y. et al., *Biocatalysis*, 3, 1990, s.317.
18. YOKOZEKI, K. et al., *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, 14, 1982, s.1.
19. NIELSEN, T., *Fett. Seifen Anstrichm.*, 87, 1985, s.15.
20. WISDOM, R.A. et al., *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 1984, s.443.
21. JANDACEK, R.J. et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 1987, s.940.
22. KAIMAL, T.N.B. - SAROJA, M., *Biotechnol. Lett.*, 10, 1988, s.337.
23. CHULALAKSANANUKUL, J.S. et al., *FEBS Letters*, 276, 1990, s.181.
24. BLAND, J.M. - CONKERTON, E.J. - ABRAHAM, G., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68, 1991, s.840.
25. ERGAN, F. - TRANI, M. - ANDRÉ, G., *Biotechnol. Bioeng.* 35, 1990, s.195.
26. KIM, J.M. - RHEE, J.S., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68, 1991, s.499.
27. SCHUCH, R. - MUKHERJEE, K.D., *Appl. Microb. Biotechnol.*, 30, 1989, s.332.
28. CHANG, P.S. - RHEE, J.S., *Biocatalysis*, 3, 1990, s.343.
29. LINFIELD, W.M. et al., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 61, 1984, s.1067.
30. KANG, S.T. - RHEE, J.S., *Biotechnol. Lett.*, 11, 1989, s.37.
31. HOQ, M.M. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1989, s.3171.
32. HAN, D. - RHEE, J.S., *Biotechnol. Lett.*, 7, 1985, s.651.
33. HAN, D. - RHEE, J.S., *Biotechnol. Lett.*, 23, 1986, s.1250.
34. KANG, S.T. - RHEE, J.S., *Biotechnol. Lett.*, 10, 1988, s.1469.
35. SZTAJER, H. - MALISZEWSKA, I. - WIECZOREK, J., *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 1988, s.492.

Do redakcie došlo 4.12.1992.

Enzyme changes of triacylglycerols

Summary

In the work we present possibilities of biomodification of simple lipides (fats and oils) by the lipase effect. Enzyme catalysed reactions of transesterification and esterification allow to obtain highquality fats and oils with regard to their nutrition and utility value. These fats with requested physical, chemical and biological characteristics may find its assertion not only in food industry, but also in pharmaceutical and cosmetic industry. We also discuss about a possibility of these lipases application for enzyme hydrolysis of fats with the aim of specific fatty acids preparation, or partial glycerols or glycerol.