



**POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY**

**KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII**

Zastosowanie lipaz do selektywnej hydrolizy estrów

**Prowadzący: mgr inż. Sebastian Derfla
Opracował: mgr inż. Sebastian Derfla**

1. Wstęp

Lipazy są jednymi z najbardziej wszechstronnych enzymów. Znajdują zastosowanie w przemysłach: farmaceutycznym, mleczarskim, środków czyszczących, kosmetycznym, oleochemicznym i innych. Według aktualnych opinii przemysłu i naukowców w nadchodzących latach nastąpi ogromny wzrost ich przemysłowego wykorzystania. Lipazy, ze względu na różnorodną specyficzność, mogą być podzielone ogólnie na pięć grup:

- Lipazy substratospecyficzne

Acyloglicerole są naturalnymi substratami lipaz. Specyficzność substratowa jest definiowana jako zdolność lipaz do preferencyjnej hydrolizy określonych estrów glicerolu. Na przykład podczas trawienia hydroliza TAG nie zachodzi do końca. W rezultacie DAG zostają przekształcone w MAG, ale hydroliza tych ostatnich zachodzi bardzo wolno. Zgodnie z tym, TAG są najbardziej faworyzowanymi substratami u większości lipaz zwierzęcych, podczas gdy MAG najmniej. TAG są również preferowanymi substratami większości lipaz roślinnych i mikrobiologicznych. Jednakże, niektóre lipazy szybciej hydrolizują niepełne glicerole niż TAG. Na przykład lipaza *Penicillium camembertii* (PCL) wykazuje wyższą preferencję w stosunku do MAG i DAG, natomiast minimalną reaktywność z TAG. Lipaza specyficzna w stosunku do MAG, pochodząca z tkanki tłuszczowej szczura, wykazuje niską aktywność do DAG i TAG. Lipaza *Penicillium sp.* Nie hydrolizuje DAG, natomiast lipaza *Penicillium cyclopium* (PYL) hydrolizuje głównie MAG i DAG zaś reakcja z udziałem TAG przebiega bardzo powoli.

- Lipazy regiospecyficzne

Specyficzność pozycyjną lub regiospecyficzność lipaz definiuje się jako zdolność tych enzymów do odróżnienia dwóch zewnętrznych pozycji (pierwszorzędowych wiązań estrowych) i wewnętrznej pozycji (drugorzędowego wiązania estrowego) szkieletu TAG. Podczas hydrolizy triacylogliceroli, lipazy *sn*-1,3-regiospecyficzne preferencyjnie hydrolizują pozycje *sn*-1 i *sn*-3, przed pozycją *sn*-2. Tym sposobem dalsza hydroliza otrzymanej mieszaniny równomolowej 1,2-diacylogliceroli (1,2-DAG) i 2,3-diacylogliceroli (2,3-DAG) prowadzi do powstania 2-monoacylogliceroli (2-MAG). Przykładem lipazy 1,3-regiospecyficznej może być wieprzowa lipaza trzustkowa (PPL) [74]. Ten typ specyficzności został opisany dla wielu lipaz (m.in. *Aspergillus niger* (ANL), *Rhizopus oryzae* (inaczej *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrizus*) (RAL)). Specyficzność w stosunku do pozycji *sn*-2 triacylogliceroli (TAG) jest bardzo rzadka. Właściwie do niedawna nauce znana była tylko jedna lipaza wykazująca taką specyficzność - lipaza *Candida antarctica A* (CALA). Jednakże, ostatnio opisano, że niektóre gatunki *Geotrichum* działają dwa razy szybciej na wiązanie estrowe w pozycji *sn*-2, niż na wiązania estrowe w pozycjach pierwszorzędowych. Dwie formy lipazy wytwarzane przez *Geotrichum candidum* charakteryzuje regiospecyficzność w stosunku do drugorzędowego wiązania estrowego trioleiny, jako substratu. Jednakże w stosunku do TAG te same lipazy wykazują odmienną specyficzność.

- Lipazy niespecyficzne

Część lipaz wykazuje niewielką lub żadną specyficzność pozycyjną i hydrolizuje wszystkie wiązania estrowe w TAG, nie biorąc pod uwagę tłuszczowych komponentów acylowych hydrolizowanego substratu. Przykładami lipaz niespecyficznych są lipazy *Penicillium expansum* (PEL), *Candida rugosa* (dawniej *Candida cylindracea*) (CRL) lub *Aspergillus sp.*, *Staphylococcus hyicus* (SHL).

- Lipazy acylospecyficzne

Lipazy mogą być specyficzne dla określonego kwasu tłuszczowego, lub bardziej ogólnie dla określonej klasy kwasów tłuszczowych. Lipazy tego typu hydrolizują estry glicerydu kwasów tłuszczowych niezależnie od ich pozycji na szkielecie glicerolu. Najlepiej poznanym enzymem tego typu jest lipaza *Geotrichum candidum* (inaczej *Oospora lactis*, *Galactomyces geotrichum*) (GCL), która jest wysoce specyficzna dla *cis*-9-nienasyconych kwasów tłuszczowych zawierających podwójne wiązanie w pozycji 9 (*cis* -9), czyli np. kwasów; oleinowego, linolowego, linolenowego[41;43]. Innym przykładem są lipazy, takie jak *Penicillium roquefortii* (PRL) i różne zwierzęce lipazy żołądkowe, specyficzne w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a wykazujące niewielką aktywność do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Występują również lipazy specyficzne dla innych kwasów tłuszczowych, na przykład lipaza *Botrytis cinerea* (BIL) jest specyficzna dla długołańcuchowych nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasów oleinowego i linolenowego).

- Lipazy stereospecyficzne

Stereospecyficzność lipaz jest definiowana jako zdolność tych enzymów do rozróżnienia konformacji przestrzennej grup acylowych. Lipazy stereospecyficzne można podzielić na: rozróżniające dwie odrębne cząsteczki enancjomerów, oraz rozróżniające dwie, chemicznie identyczne, ale stereochemicznie różne enancjomeryczne grupy wewnątrz prochiralnych cząsteczek substratu, oznacza to, że w mieszaninie racemicznej związku chemicznego katalizują one przemiany tylko jednego z obecnych w niej cząsteczek enancjomeru (R)- lub (S)-. W obu przypadkach hydrolizę jednego pierwszorzędowego wiązania estrowego określa się mianem *sn*-1 lub *sn*-3 stereospecyficzności. Przykładami lipaz typu *sn*-1 stereospecyficznych są: *Humicola lanuginosa* (HLL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL), lipaza lipoproteinowa (LPL) z mleka wołowego, natomiast *sn*-3 stereospecyficznych - *Candida antarctica B* (CALB), *Fusarium solani* (FSL), psia lipaza żołądkowa, ludzka lipaza żołądkowa (HGL), podczas gdy PPL nie wykazała znaczącej stereoselektywności, podczas analiz w analogicznych warunkach.

Wszechobecność lipaz w naturze odzwierciedla ich kluczową rolę w przemianach tłuszczów. Poza ich szczególnym znaczeniem fizjologicznym w metabolizmie lipidów, enzymy te wykazują specjalne właściwości katalityczne, dzięki którym mogą stanowić atrakcyjne narzędzie do przemysłowych zastosowań.

Katalizowanie reakcji przez lipazy w środowisku o kontrolowanej zawartości wody (współczynniku aktywności wodnej) możliwe jest w środowisku rozpuszczalników organicznych, płynów nadkrytycznych, cieczy jonowych, stałych buforów etc.

2. Materiały i odczynniki

Kolba stożkowa o pojemności 250 ml.
Kolba okrągłodenna o pojemności 250 ml.
Lejek
Bibuła filtracyjna
Mieszadło magnetyczne
Element mieszający
Kolumna chromatograficzna
Cylinder miarowy poj. 100ml.
Enzym
Bufor fosforanowy pH=7,0
Dimetyloformamid (DMF)
Penta-O-acetylo- α -D-glukopiranoza
Chloroform
Metanol
Octan Etylu

3. Wykonanie ćwiczenia

W kolbie płaskodennej o pojemności 250 ml. rozpuścić 750 mg peracetylowanego cukru w 10% r-r dimetyloformamidu w buforze fosforanowym (10mg cukru/ml buforu). Po rozpuszczeniu cukru dodać enzym lipazę (0,75g/mmol cukru) i mieszać powstałą zawiesinę w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC stosując układ rozwijający chloroform/metanol (5:1).

Po stwierdzeniu prawie całkowitego przereagowania substratu mieszaninę reakcyjną ekstrahować trzykrotnie octanem etylu stosując porcje równe objętości mieszaniny reakcyjnej.

Połączone warstwy organiczne osuszyć nad bezwodnym siarczanem sodu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyszczany za pomocą chromatografii kolumnowej. Po zebraniu odpowiednich frakcji odparowujemy próżniowo rozpuszczalnik i wyznaczamy masę powstałego produktu w celu oznaczenia wydajności przeprowadzonej reakcji.