

STRESZCZENIE

Zdolność lipaz do przeprowadzania specyficznych reakcji transformacji (biotransformacji) sprawia, że enzymy te stały się użytecznym narzędziem stosowanym w wielu procesach syntezy, np. w syntezie detergentów, kosmetyków, biosurfaktantów, w przemyśle olejowo-chemicznym, papierniczym, mleczarskim, spożywczym czy farmaceutycznym. Lipazy są wszechobecnymi enzymami, ale jedynie te wytwarzane przez mikroorganizmy znajdują zastosowanie w przemyśle, ze względu na interesujące właściwości, takie jak stabilność w rozpuszczalnikach organicznych, działanie w łagodnych warunkach środowiska reakcji, szeroka specyficzność substratowa, regio- i enancjoselektywność, a także stosunkowo proste metody ich wytwarzania i odzyskiwania z podłoża pochodowlanego. W niniejszej pracy dokonano przeglądu najnowszych osiągnięć dotyczących otrzymywania lipaz w procesie fermentacji węgłębnej oraz na podłożach stałych z wykorzystaniem odpadowych produktów pochodzących z przemysłu rolniczego. Ponadto, omówiono nowe zastosowania biotechnologiczne lipaz, m.in. do syntezy biopolimerów i biodiesla oraz do wytwarzania enancjometrycznych farmaceutyków, agrochemikaliów i związków smakowo-zapachowych.

WPROWADZENIE

Lipazy (acylohydrolazy triacyloglicerolu, EC 3.1.1.3) to jedna z ważniejszych grup enzymów, mająca wszechstronne zastosowania przemysłowe, wynikające z ich unikatowych właściwości [1,2]. Cechą charakterystyczną lipaz odróżniającą je od innych enzymów jest działanie na substraty nierozpuszczalne w wodzie. Decyduje to o przebiegu reakcji na granicy pomiędzy fazą substratu nierozpuszczalnego w wodzie i fazą wodną, w której rozpuszczony jest enzym. Szybkość reakcji zależy od wielkości powierzchni kontaktu enzymu z substratem [3].

Lipazy to enzymy wszechstronne, zdolne do katalizowania kilku typów reakcji, takich jak hydroliza, estryfikacja oraz interestryfikacja, która obejmuje alkoholizę, acydolizę i transestryfikację (Ryc. 1). W środowisku wodnym lipazy katalizują reakcję hydrolizy triacylogliceroli, uwalniając do podłoża diacyloglicerol, monoacyloglicerol, glicerol i kwasy tłuszczowe. W środowisku rozpuszczalników organicznych dochodzi do tworzenia wiązań estrowych pomiędzy alkoholem (glicerolem) i resztami kwasów tłuszczowych. Najważniejsze w tym procesie jest utrzymanie na niskim poziomie ilości wody, ponieważ w tych warunkach estryfikacja jest reakcją dominującą, a hydroliza triacylogliceroli przebiega na minimalnym poziomie. Zawartość wody w mieszaninie reakcyjnej jest więc kluczowym parametrem, ponieważ zmienia równowagę termodynamiczną reakcji [2]. Większość lipaz wykazuje wysoką aktywność w stosunku do lipidów zawierających kwasy tłuszczowe o długości łańcucha od C_8 do C_{18} . Lipazy różnią się między sobą cechami biochemicznymi, takimi jak: specyficzność substratowa, wrażliwość na inhibitory, wymagania w stosunku do aktywatorów czy optymalne warunki reakcji oraz właściwościami fizycznymi, takimi jak: masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, optymalna wartość pH reakcji i termostabilność [4].

WYSTĘPOWANIE LIPAZ

Lipazy to enzymy szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Wytwarzane są przez organizmy zwierzęce, roślinne oraz mikroorganizmy. Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego stanowią klasę enzymów najszerzej stosowaną w aplikacjach biotechnologicznych i syntezie organicznej. Do mikroorganizmów wytwarzających lipazy należą bakterie, drożdże i grzyby. Przemysłowe zapotrzebowanie na nowe źródła lipaz, z różnymi właściwościami katalitycznymi, stymuluje izolację i wybór nowych szczepów. Przegląd opisanych w ciągu ostatnich trzech lat mikroorganizmów zdolnych do syntezy lipazy w procesie fermentacji przedstawiono w tabeli 1 (Tab. 1).

Renata Banczerz✉

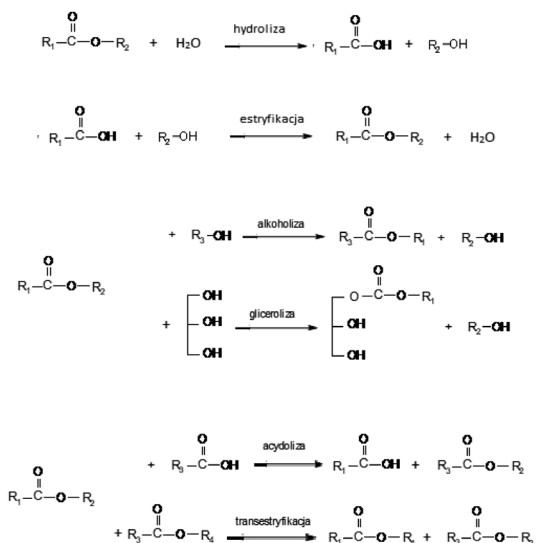
Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

✉Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 50 29, e-mail: renata.banczerz@poczta.umcs.lublin.pl

Artykuł otrzymano 1 grudnia 2017 r.
Artykuł zaakceptowano 11 grudnia 2017 r.

Słowa kluczowe: lipazy, synteza enzymów, fermentacja, zastosowanie przemysłowe

Wykaz skrótów: SSF (ang. *solid state fermentation*) – fermentacja na podłożach stałych; SmF (ang. *submerged fermentation*) – fermentacja węgłębna; EPS (ang. *Exopolysaccharides*) – egzopolisacharydy; PUFA (ang. *polyunsaturated fatty acids*) – wielonienasycone kwasy tłuszczowe



Rycina. 1. Rodzaje reakcji katalizowanych przez lipazę w zależności od środowiska reakcji.

Mikroorganizmy syntetyzujące lipazy znajdują się w różnych siedliskach, takich jak odpady z zakładów przetwórstwa olejów roślinnych i zakładów mleczarskich oraz gleby zanieczyszczone między innymi olejami i nasionami oleistymi [22]. Drobnoustroje zdolne do syntezy lipazy pozyskiwane są ze szczepów mezo-, psychro- oraz termofilnych. Lipazy w zależności od miejsca nagromadzenia w hodowli możemy podzielić na pozakomórkowe i wewnątrzkomórkowe. W porównaniu z lipazami zewnątrzkomórkowymi, enzymy wewnątrzkomórkowe poznane są w mniejszym stopniu ze względu na trudności związane z ich izolacją z komórki.

PRODUKCJA LIPAZ NA ODPADACH PRZEMYSŁOWYCH

Lipazy o znaczeniu biotechnologicznym można wytwarzać zarówno w procesie fermentacji węgłowej, jak i fermentacji na podłożach stałych. Chociaż większość procesów komercyjnych jest obecnie oparta na fermentacji węgłowej, to w ostatnim czasie zaobserwowano rosnące zainteresowanie hodowlą mikroorganizmów syntetyzujących lipazę na stałych podłożach, głównie ze względu na dostępność tanich źródeł węgla, takich jak pozostałości rolnicze, które można wykorzystać ponownie do wzrostu drobnoustrojów. Zjawisko powtórnego wykorzystania i recyklingu substancji organicznych zostało określone jako „czysta technologia”. Jest to technika, w której produkty stanowiące zagrożenie dla środowiska, wykorzystywane są po raz kolejny w celu uzyskania nowych związków [23]. Wykorzystanie odpadów agroprzemysłowych zapewnia więc alternatywne substraty do hodowli i może pomóc w rozwiązaniu problemów związanych z zanieczyszczeniami. Przyczynia się też do tworzenia podłoży hodowlanych, które z jednej strony mogą obniżyć koszty produkcji w skali przemysłowej, które często ograniczają stosowanie lipaz jako biokatalizatorów, a z drugiej pozwolą pozyskać enzymy o wysokiej aktywności [24]. Wiele mikroorganizmów jest zdolnych do syntezy lipaz podczas wzrostu na odpadach organicznych. Wynika to z faktu, że odpady pochodzące z przemysłu rolniczego stanowią źródło składników odżywczych, które mogą służyć jako pożywka wzrostowa dla drobnoustrojów wytwarzających lipazy. Od-

padów rolnicze stanowią bogate zasoby do wykorzystania w różnego rodzaju procesach biotechnologicznych, głównie ze względu na ich niski koszt, dostępność i składniki odżywcze. Znanych jest wiele doniesień [25,26] na temat wykorzystania odpadów rolno-spożywczych, takich jak otręby pszenne, ryżowe, sojowe, melasa czy makuchy. W tabeli 2 przedstawiono niektóre mikroorganizmy wykorzystujące odpadowe produkty przemysłu rolniczego do syntezy enzymów lipolitycznych. Wśród pozostałości rolniczych wykorzystywanych do syntezy lipaz, makuchy stanowią najbardziej rozpowszechnione podłoża. Są one produktami ubocznymi po ekstrakcji oleju z nasion roślin oleistych. Zawierają resztkowe składniki odżywcze, które mogą służyć zarówno jako źródło węgla, jak i azotu, a także są induktorami syntezy lipaz [43]. Wytwarzanie lipazy z użyciem makuchów jest jednym z pierwszych doniesień, gdzie opisano *Penicillium chrysogenum* S1, który w czasie wzrostu na podłożu zawierającym 10% makuchy sezamowe wytwarzał wysokoaktywną lipazę [44].

TECHNIKI FERMENTACJI STOSOWANE DO OTRZYMYWANIA LIPAZ

W ostatnich latach opracowano i dokładnie opisano różne techniki wysoko wydajnej produkcji lipaz, posiadających właściwości aplikacyjne - szeroką specyficzność substratową, termostabilność i stabilność w rozpuszczalnikach organicznych. Fermentacja na podłożu stałym (SSF) i fermentacja węgłowa (SmF) to dwie powszechnie stosowane metody produkcji lipaz. SmF to technika, w której mikroorganizmy są zawieszone w płynnym podłożu zawierającym rozpuszczone składniki odżywcze. Około 90% wszystkich przemysłowych enzymów jest wytwarzana technikami SmF [45]. Proces SSF dotyczy hodowli mikroorganizmów na wilgotnych, stałych podłożach, na obojętnych nośnikach lub na nierozpuszczalnych podłożach, które wykorzystuje się jako składniki odżywcze i źródło energii dla wzrostu drobnoustrojów. Istotnym parametrem dla hodowli SSF jest ilość wody w takiej stałej matrycy, która musi wystarczyć do wzrostu i metabolizmu mikroorganizmów. Mikroorganizmy nie tylko rosną na powierzchni stałego nośnika, ale również wnikają głęboko w przestrzeń międzykomórkową i do wnętrza komórek [46].

Wśród różnych grup mikroorganizmów, grzyby nitkowate są najlepiej przystosowanymi gatunkami do hodowli na podłożach stałych. Wynika to z ich zdolności do wzrostu na powierzchni różnych podłoży i możliwości wnikania w przestrzeń międzycząsteczkową stałych matryc. W naturalnych siedliskach, grzyby te zazwyczaj rosną w związkach symbiotycznych na podłożach stałych, takich jak gleba czy materiały roślinne [47]. Bakterie i drożdże są hodowane głównie w procesach SmF. Porównanie aktywności lipaz otrzymywanych metodami SmF i SSF jest trudne ze względu na różnice w stosowanych metodach oznaczania aktywności tych enzymów.

ZASTOSOWANIE LIPAZ W PRZEMYSŁE

Stosowanie lipaz w różnych gałęziach przemysłu znane jest od kilkudziesięciu lat, jednak ze względu na wysokie koszty pozyskiwania tych enzymów ich udział w rynku był niewielki. W związku z wykorzystaniem w ostatnich kilku latach technik rekombinacji DNA, możliwe stało się tworzenie nowych mikrobiologicznych szczepów produkujących

Tabela 1 Wybrane mikroorganizmy zdolne do syntezy lipazy o specyficznych właściwościach decydujących o ich wykorzystaniu w przemyśle.

Źródło	Gatunek	Właściwości lipazy	Piśmiennictwo
Bakterie	<i>Staphylococcus chromogenes</i> O1A	alkaliczna	Golani i in. 2016 [5]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	termostabilna, alkaliczna	Awad i in. 2016 [6]
	<i>Bacillus cereus</i> ASSCRC-P1	termostabilna	Goswami i in. 2017 [7]
	<i>Staphylococcus warneri</i>	termostabilna, stabilna w rozpuszczalnikach organicznych	Yele i in. 2015 [8]
	<i>Bacillus coagulans</i> VKL	termostabilna, stabilna w rozpuszczalnikach organicznych	Gowthami i in. 2015 [9]
	<i>Burkholderia cepacia</i>	alkaliczna	Liew i in. 2015 [10]
	<i>Brevibacterium halotolerans</i> PS4 KX671556	termostabilna, stabilna w rozpuszczalnikach organicznych	Sharma i in. 2017 [11]
Grzyby	<i>Rhizomucor variabilis</i>	alkaliczna, stabilna w EPS	Bancerz i in. 2016 [12]
	<i>Geotrichum candidum</i>	termostabilna	Maldonado i in. 2016 [13]
	<i>Rhizomucor endophyticus</i>	stabilna w niskich temperaturach	Yan i in. 2016 [14]
	<i>Aspergillus niger</i>	stabilna w niskich temperaturach	Utami i in. 2017 [15]
	<i>Penicillium</i> sp.	stabilna w niskich temperaturach i w szerokim zakresie pH	Pandey i in. 2016 [16]
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	termostabilna	Piscitelli i in. 2017 [17]
Drożdże	<i>Candida viswanathii</i>	stabilna w rozpuszczalnikach organicznych	Almeida i in. 2016 [18]
	<i>Candida guilliermondii</i>	stabilna w rozpuszczalnikach organicznych	Oliveira i in. 2014 [19]
	<i>Cryptococcus</i> sp. MTCC 5455	pełna hydroliza poliesterów biodegradowalnych	Thirunavukarasu i in. 2016 [20]
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	szeroka specyficzność substratowa	Louhasakul i in. 2016 [21]

ściśle określone, komercyjnie użyteczne enzymy lipolityczne [48]. Wykorzystanie do hodowli odpadów z przemysłu rolno-spożywczego również przyczyniło się do zmniejszenia kosztów produkcji lipaz na skalę przemysłową. Obecnie lipazy wykorzystywane są m.in. w produkcji detergentów, biosurfaktantów, leków, kosmetyków, a także w przemyśle olejowo-chemicznym, mleczarskim oraz papierniczym.

PRODUKCJA DETERGENTÓW

Najważniejsze i najbardziej komercyjne zastosowanie właściwości hydrolitycznych lipaz to dodawanie ich do detergentów, które głównie wykorzystuje się w środkach piorących, czyszczących oraz w płynach do zmywania. Zapotrzebowanie na enzymy usuwające tłuste plamy już w niskich temperaturach przyczyniło się do stworzenia nowych preparatów enzymatycznych [49]. Pierwszy komercyjny preparat enzymatyczny zawierający zewnątrzkomórkową lipazę grzybową to „Lipolase”, wyprodukowany przez firmę Novo Nordisk w 1994. Rok później wprowadzono na rynek dwa kolejne preparaty, tym razem zawierające lipazy bakteryjne, a mianowicie „Lumafast” oraz „Lipomax” [50].

Lipazy dodawane do środków piorących muszą spełniać konkretne wymagania:

- powinny hydrolizować tłuszcze o różnym składzie, czyli posiadać niską specyficzność substratową;

- powinny być odporne na niekorzystne warunki procesu prania, a więc stabilne w pH 10–11 oraz w temperaturze 30–60°C;
- powinny być odporne na szkodliwe działanie surfaktantów i enzymów (m.in. proteaz), będących składnikami wielu detergentów [48].

Podczas procesu prania, lipaza adsorbuje się na powierzchni tkaniny tworząc z nią stabilny kompleks, który następnie działa na plamy olejowe i hydrolizuje je. Kompleks ten jest odporny na surowe warunki prania i zatrzymuje się na tkaninie podczas prania [51].

Szczególne zastosowanie jako dodatki do detergentów i środków piorących znalazły enzymy aktywne w niskich temperaturach, gdyż obniżenie temperatury używania środków piorących daje znaczne oszczędności energii oraz korzyści ekonomiczne [16,49]. Lipazy znalazły również zastosowanie w produkcji tzw. aktywatorów wybielaczy, które są składnikami środków piorących. Związki te posiadają reaktywną grupę acylową i w wyniku rozkładu nadtlenku wodoru katalizują reakcję syntezy nad-tlenków karboksylowych usuwających różnego rodzaju plamy [52].

Tabela 2. Wybrane mikroorganizmy produkujące lipazę w hodowlach fermentorowych wglębnych oraz na podłożach stałych z wykorzystaniem pozostałości z przemysłu rolniczego.

Mikroorganizm	Odpady z przemysłu rolniczego	Aktywność lipazy	Piśmiennictwo
FERMENTACJA WGLĘBNA			
<i>Candida rugosa</i>	180–260 g melasy sojowej	12,15 U/ml	Morais i in. 2016 [27]
<i>Geotrichum candidum</i>	200–320 g melasy sojowej	11,48 U/ml	Morais i in. 2016 [27]
<i>Aspergillus</i> sp.	10% otręby pszenne	4,52 U/ml	Colla i in. 2010 [28]
<i>Rhizomucor miehei</i> 6516 <i>Aspergillus niger</i> CBS 360.62	wytłoki z jatrofy	14,57 U/ml 5,53 U/ml	Ilmi i in. 2017 [29]
<i>Candida rugosa</i> ATCC 14830	1% odpady po zmydłaniu tłuszczów	7,5 U/ml 7 U/ml	Abdelmoez i in. 2013 [30]
<i>Penicillium verrucosum</i>	namok kukurydziany Prodex Lac (hydrolizat drożdżowy)	2,22 u/ml	Pinheiro i in. 2008 [31]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	odpady po tłoczeniu oliwy z oliwek (OMW)	0,16 U/ml	Moftah i in. 2013 [32]
<i>Penicillium citrinum</i> MKF3	20% oleje lecznicze z farmaceutyków ajurwedyjskich	266 U/ml	Kumar i in. 2016 [33]
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	odpady po produkcji oleju kokosowego w stężeniu do 20 g/l	22,28 U/ml	Kammani i in. 2015 [34]
FERMENTACJE NA PODŁOŻACH STAŁYCH			
<i>Penicillium</i> sp	10 g otrąb sojowych	15,17 U/ml	Wolski i in. 2009 [35]
<i>Aspergillus niger</i>	2% otręby ryżowe	38,67 U/g	Utami i in. 2017 [36]
<i>Aspergillus fumigatus</i> MTCC 9657	10 g odtłuszczonych otrąb ryżowych	7,88 U/ml	Rajan i in. 2011 [37]
<i>Trichoderma</i>	odpady po ekstrakcji oleju palmowego z owoców	0,16 U/g	Musa i in. 2017 [38]
<i>Aspergillus niger</i>	20 g wytlóków z orzeszków drzewa masłowego	49,37 U/g	Salihu i in. 2016 [39]
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 6808	wytłoki z orzeszków ziemnych	4,5 U/g	Chaturvedi i in. 2010 [40]
<i>Penicillium brevicompactum</i>	wytłoki rycynowe	87,7 U/g	Silva i in. 2011 [41]
<i>Aspergillus candidus</i> URM 5611	75% otręby migdałowe	395 U/g	Farias i in. 2015 [42]

PRZEMYSŁ SPOŻYWCZY

W tej branży lipazy katalizują przede wszystkim reakcje syntezy krótkołańcuchowych estrów smakowych i zapachowych, np. octanu izoamylu. Lipazy stosowane są również przy produkcji serów, m.in. przyspieszając ich dojrzewanie. Podczas hydrolizy tłuszczu zawartego w mleku, z którego produkowane są sery, powstają również kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha, nadając serom określony i charakterystyczny smak oraz aromat. Jeśli lipazy uwalniają kwasy o krótkich (C_4 , C_6) łańcuchach węglowych, sery posiadają wówczas ostry smak i zapach, zaś kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach (C_{12} , C_{14}) nadają serom słodki, łagodny smak. Z udziałem lipaz przygotowywane są również tzw. sery modyfikowane, które zyskują odpowiedni smak w procesie inkubacji z enzymem w podwyższonej temperaturze. Substytut masła kakaowego to kolejny produkt otrzymywany z wykorzystaniem 1,3-specyficznych lipaz w reakcji acydolizy oleju palmowego i kwasu stearynowego. Główną cechą stanowiącą o wartości tego masła jest jego krystaliczna struktura, skład chemiczny prawie taki sam jak naturalnego masła kakaowego oraz temperatura topnienia w zakresie 25–35°C [52,53].

PRZEMYSŁ KOSMETYCZNY

Przemysł kosmetyczny to kolejna dziedzina, w której lipazy znajdują szerokie zastosowanie. Otrzymywane dzięki immobilizowanej lipazie z *Rhizomucor miehei* estry mirystynianu i palmitynianu izopropylu oraz palmitynian 2-etyloheksylu służą do wytwarzania emolientów. Są to substancje zapewniające skórze gładkość, sprężystość i odpowiedni stopień nawilżenia [54]

Wykorzystywana w przemyśle perfumeryjnym reakcja przekształcania hydroksykwasów do makrocyclicznych mono- i oligolaktonów, posiadających zapach piżmowy, katalizowana jest także przez lipazy. Jest to prosta, jednoetapowa reakcja, w przeciwieństwie do stosowanej wcześniej wieloetapowej i energochłonnej metody chemicznej [3]. Natomiast japoński koncern Miyoshi Oil & Fat Co. z powodzeniem stosuje lipazę pochodzącą z *Candida cylindracea* do otrzymywania kwasów tłuszczowych będących substratami w syntezie mydła. Otrzymany produkt ma lepszą jakość oraz niższą cenę w porównaniu do mydeł otrzymanych typowymi metodami [3].

PRZEMYSŁ PAPIERNICZY

Lipofilowe żywice zawarte zwykle w drewnie utrudniają produkcję papieru, obniżają jego jakość, przyspieszają żółknięcie oraz zwiększają chlorowanie miazgi drzewnej w celu jej wybielenia [52]. Wytwarzanie pulpy drzewnej metodą chemiczną, czyli gotowanie jej z siarczanami w zasadowym środowisku, zmniejszało zawartość żywicy, ale nie eliminowało jej całkowicie. Opracowano więc enzymatyczną technologię usuwania żywicy z drewna miękkiego brzozy i sosny. Lipazy z *Aspergillus* sp., czy *Candida rugosa* usuwają triacyloglicerole, które są głównymi składnikami kleistych żywic [55].

PRZEMYSŁ FARMACEUTYCZNY

Zdolność stereoselektywnych lipaz do produkcji optycznie czystych enancjomerów została wykorzystana w przemyśle farmaceutycznym do syntezy leków. Czyste enancjomery wykazują większą skuteczność działania, a także mniejszą ilość skutków ubocznych. Lipazy znalazły więc zastosowanie w produkcji:

- niesteroidowych leków przeciwzapalnych, m.in. ibuprofenu, naproxenu [56];
- leków stosowanych w nadciśnieniu, takich jak: zofenapril, lisinopril [57];
- leków blokujących kanały wapniowe: diltiazemu [58];
- chiralnego półproduktu używanego do syntezy silnego leku przeciwnowotworowego: epothilonu [59];
- (1S,2S)-trans-2-metoksycykloheksanolu – substratu do syntezy antybiotyków β -laktamowych [59];
- (2R,3S)-ester metylometoksyfenyloglicydolu – półproduktu do produkcji leków działających na układ krążenia [59].

Oznaczanie poziomu lipaz w surowicy krwi może być również wykorzystywane jako narzędzie diagnostyczne do wykrywania schorzeń, m.in.: ostrego zapalenia czy uszkodzenia trzustki [60].

PRODUKCJA ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN

Do produkcji niektórych środków ochrony roślin wykorzystywane są czyste enancjomery. Przykładem jest (S)-indanofan, który jest stosowany w zwalczaniu chwastów zarastających pola ryżowe. Lipaza z *Pseudomonas cepacia* hydrolizuje octan 1-(4-fenoksy-fenoksy)-1-propylu i w wyniku tej reakcji powstaje analog owadziego hormonu juwenilnego, który dodawany jest do wysokoselektywnych insektycydów regulujących wzrost owadów [52].

PRODUKCJA BIOPALIW

Globalne wyczerpywanie się paliw kopalnych oraz wzrost świadomości ekologicznej powoduje stale rosnące zainteresowanie paliwami drugiej generacji, tj. biodieslem. Biodiesel to estry długołańcuchowych kwasów tłuszczo-

wych pochodzące z odnawialnych źródeł lipidowych, takich jak oleje roślinne lub tłuszcze zwierzęce. Paliwo to jest nietoksyczne i niepalne, odznacza się mniejszą zawartością tlenu węgla i czasem azotu, ogranicza zużycie ropy naftowej oraz ulega biodegradacji. Wytwarzane jest w reakcji transestryfikacji metodą chemiczną lub enzymatyczną. Metody enzymatyczne mogą być jednak bardziej efektywne, stąd do otrzymania biopaliw wykorzystywane są preparaty lipaz, głównie grzybowych i drożdżowych, m.in. z *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor oryzae*, *Aspergillus niger* oraz *Candida antarctica*. Doświadczalnie, jako substraty do tej reakcji używane są oleje roślinne (sojowy, rzepakowy) oraz alkohole krótkołańcuchowe (metanol, etanol, butanol) [61].

INNE ZASTOSOWANIA SYNTETYZOWANYCH ESTRÓW

Obecnie wiele estrów wykorzystywanych w przemyśle produkowanych jest metodami chemicznymi. Jednak metody te wymagają wysokiej temperatury i ciśnienia, stąd w wielu przypadkach utrudniona jest estryfikacja z wykorzystaniem związków niestabilnych, takich jak wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), kwas askorbinowy czy poliiole. Substancje te wymagają dodatkowych zabiegów ochronnych, a to z kolei powoduje wzrost kosztów produkcji. Zastosowanie lipaz w reakcjach estryfikacji pozwoliło pokonać te przeszkody. Synteza estrów katalizowana przez lipazy ma wiele zalet, m.in. łagodne warunki reakcji, jednoetapowa synteza bez konieczności dodatkowej ochrony substratów oraz łatwe stosowanie estrów w różnych gałęziach przemysłu. Estry długołańcuchowych kwasów (C_{12} – C_{20}) i długołańcuchowych alkoholi stosowane są jako smary syntetyczne i plastyfikatory, zapobiegające kruszeniu się tworzyw sztucznych [62]. Estry te znajdują też zastosowanie jako antystatyki do polimerów. Estry długołańcuchowych kwasów i krótkołańcuchowych alkoholi (C_3 – C_8) stosowane są w przemyśle spożywczym, kosmetycznym oraz farmaceutycznym. Estry krótkołańcuchowych kwasów i alkoholi są wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym i spożywczym jako substancje zapachowe i smakowe. Estry cukrowe kwasów tłuszczowych to niejonowe surfaktanty używane w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. Estry hydroksykwasów, takich jak kwas mlekowy i cytrynowy to surfaktanty dodawane do wypieku chleba, ciast, pączków a także do lodów oraz zabielaaczy do kawy i herbaty [63,64].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie lipaz jako biokatalizatorów stanowi atrakcyjną i przyjazną dla środowiska alternatywę dla syntez chemicznych. Stale rosnące zapotrzebowanie na te enzymy sprawia, że badania rozwijają się w kierunku poszukiwania nowych mikroorganizmów wytwarzających lipazy, ulepszenia właściwości istniejących już biokatalizatorów do konkretnych znanych zastosowań przemysłowych oraz wytwarzania nowych enzymów dostosowanych do zupełnie nowych reakcji. Lipazy są jednymi z najbardziej wszechstronnych enzymów dostępnych w przyrodzie. Posiadają unikalne właściwości, począwszy od zdolności do działania na granicy faz, do utrzymywania wysokiej aktywności i stabilności w rozpuszczalnikach organicznych. Enzymy te są atrakcyjne ze względu na ich zastosowanie w przemyśle spożywczym, tekstylnym, paliwowym, mleczarskim, skórzanym, farma-

ceutycznym, papierniczym oraz w detergentach. Ogromny potencjał lipaz w różnych branżach wskazuje na potrzebę opracowania nowatorskich, opłacalnych technologii zwiększenia produkcji tych enzymów z wykorzystaniem tanich, odnawialnych odpadów agroprzemysłowych.

PIŚMIENNICTWO

- Abhijit R (2012) Application of lipase in industry. A J P Tech 2: 33-37
- Sharma S, Kanwar SS (2014) Organic solvent tolerant lipases and applications. The Scientific World Journal 2014, ID 625258, str 15
- Adamczak M, Bednarski W (1994) Lipazy – narzędzie w biotechnologii tłuszczów i olejów. Biotechnologia 4: 140-153
- Haas MJ, Cichowicz DJ, Bailey DG (1992) Purification and characterization of extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. Lipids 27: 571-576
- Golani M, Hajela K, Pandey GP (2016) Screening, identification, characterization and production of bacterial lipase from oil spilled soil. Int J Curr Microbiol App Sci 5: 745-763
- Awad GEA, Mostafa H, Danial EN, Abdelwahed NAM, Awad HM (2015) Enhanced production of thermostable lipase from *Bacillus cereus* ASSCRC-P1 in waste frying oil based medium using statistical experimental design. J Appl Pharm Sci 5: 7-15
- Goswami VK, Sharma JG (2017) An intermediate temperature stable, extracellular and alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in biodiesel production. AJAST 1: 104-115
- Yele VU, Desai K (2015) A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. Appl Biochem Biotech 175: 855-869
- Gowthami P, Muthukumar K, Velan M (2015) Utilization of coconut oil cake for the production of lipase Using *Bacillus coagulans* VKL1. Biocontrol Science 20: 125-133
- Liew YX, Chan YJ, Show PL, Manickam S, Chong MF (2015) Optimization of alkaline lipase production from *Burkholderia cepacia* through submerged fermentation. Chem Eng Trans 45: 1675-1680
- Sharma P, Sharma N, Sharma P, Pathania S, Handa S (2017) Purification and characterization of a halotolerant and thermotolerant lipase produced from a novel bacteria "*Brevibacterium halotolerans* PS4 [KX671556]" and its application in detergent formulations. Proc Indian Natn Sci Acad 83: 681-687
- Bancerz R, Osińska-Jaroszuk M, Jaszek M, Janusz G, Stefaniuk D, Sulej J, Janczarek M, Jarosz-Wilkolazka A, Rogalski J (2016) New alkaline lipase from *Rhizomucor variabilis*: Biochemical properties and stability in the presence of microbial EPS. Biotechnol Appl Biochem 63: 67-76
- Maldonado RR, Pozza EL, Aguiar-Oliveira E, Costa FAA, Filho FM, Rodrigues MI (2016) Characterization of crude and partially purified lipase from *Geotrichum candidum* obtained with different nitrogen sources. J Am Oil Chem Soc 93: 1355-1364
- Yan Q, Duan X, Liu Y, Jiang Z, Yang Z (2016) Expression and characterization of a novel 1,3-regioselective cold-adapted lipase from *Rhizomucor endophyticus* suitable for biodiesel synthesis. Biotechnol Biofuels 9: 86
- Utami T, Hariyani I, Alamsyah G., Hermansyah H (2017) Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. Energy Procedia 136: 41-46
- Pandey N, Dhakar K, Jain R, Pandey A (2016) Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. Mycosphere doi 10.5943/mycosphere/si/3b/5
- Piscitelli A, Tarallo V, Guarino L, Sannia G, Birolo L, Pezzella C (2017) New lipases by mining of *Pleurotus ostreatus* genome. PLoS ONE 12: e0185377
- Almeida AF, Dias KB, da Silva ACC, Terrasan CRF, Tornisielo P, Carmona EC (2016) Agroindustrial wastes as alternative for lipase production by *Candida viswanathii* under solid-state cultivation: purification, biochemical properties, and its potential for poultry fat hydrolysis. Enzyme Res doi.org/10.1155/2016/1353497
- Oliveira AC, Fernandes ML, Mariano AB (2014) Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii* Braz J Microbiol 45: 1503-1511
- Thirunavukarasu K, Purushothaman S, Sridevi J, Aarthi M, Gowthaman MK, Nakajima-Kambe T, Kamini NR (2016) Degradation of poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues. Int Biodeterior Biodegradation 110: 99-107
- Louhasakul Y, Cheirsilp B, Prasertsan P (2016) Valorization of palm oil mill effluent into lipid and cell-bound lipase by marine yeast *Yarrowia lipolytica* and their application in biodiesel production. Waste Biomass Valor 7: 417
- Colen G, Junqueira RG, Moraes-Santos T (2006) Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World J Microb Biot 22: 881-885
- Haba E, Espuny MJ, Busquets M, Manresa A (200) Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. J Appl Microbiol 88: 379-387
- Rigo E, Ninowa JL, Di Luccio M, Oliveira JV, Polloni A, Remonato D (2010) Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. LWT- Food Sci Technol 43: 1132-1137
- Lopez E, Deive FJ, Longo MA, Sanroman MA (2010) Strategies for utilisation of food processing wastes to produce lipases in solid-state cultures of *Rhizopus oryzae*. Bioprocess Biosyst Eng 33: 929-935
- Prasad MP, Manjunath K (2011) Comparative study on biodegradation of lipid-rich waste water using lipase producing bacteria species. Indian J Biotechnol 10: 121-124
- Moraes Júnior WG, Kamimura ES, Ribeiro EJ, Pessela BC, Cardoso VL, de Resende MM (2016) Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugose* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. Protein Expres Purif 123: 26-34
- Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr ChO, Bertolin TE, Costa JAV (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. Bioresource Technol, 101: 8308-8314
- Ilmi M, Hidayat C, Hastuti P, Heeres HJ, van der Maare MJEC (2017) Utilisation of *Jatropha* press cake as substrate in biomass and lipase production from *Aspergillus niger* 6516 and *Rhizomucor miehei* CBS 360.62. Biocatal Agricultural Biotechnol 9: 103-107
- Abdelmoez W, Mostafa NA, Mustafa A (2013) Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. J Clean Prod 59: 290-297
- Pinheiro TF, Menoncin S, Domingues NM, Oliveira D, Treichel H, Di Luccio M, Freire DMG (2008) Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. Food Sci Tech 28: 444-450
- Moftah OAS, Grbavcic S, Moftah WAS, Lukovic ND, Prodanovic OL, Jakovetic SM, KnezevicJugovic ZD (2013) Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. J Serb Chem Soc 78: 781-794
- Kumar NV, Rani ME, Gunaseeli R, Kannan ND (2016). Utilization of medicinal oil effluent for lipase production by *Penicillium citrinum* MKF3. Integrated Waste Management in India. Marimuthu Prashanthi, Rajakumar Sundaram (red). ISBN: 978-3-319-27226-9 (Print) 978-3-319-27228-3 str. 125-132
- Kanmani P, Kumaresan K, Aravind J (2015) Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. Electron J Biotechnol 18: 20-28
- Wolski E, Menusi E, Remonato D, Vardanega R, Arbter F, Rigo E, Ninow J, Mazutti MA, Di Luccio M, de Oliveira D, Treichel H (2009) Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. LWT - Food Sci Tech 42: 1557-1560
- Utami TS, Hariyani I, Alamsyah G, Hermansyah H (2017) Production of dry extract extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid state

- fermentation method to catalyze biodiesel synthesis. *Energy Procedia* 136: 41-46
37. Rajan A, Naira AJ (2011) A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. *Turk J Biol* 35: 569-574
 38. Musa H, Han PCh, Kasim FH, Gopinath SCB, Ahmad MA (2017) Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. *Process Biochem* 63: 35-41
 39. Salihu A, Bala M Alam MZ (2016) Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. *J Taibah Univ Sci* 10: 850-859
 40. Chaturvedi M, Singh M, Man CR, Pandey S (2010) Lipase production from *Bacillus subtilis* MTCC 6808 by solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrate. *Res J Microbiol* 5: 725-730
 41. Silva MF, Freire DMG, de Castro AM, Di Luccio M, Mazutti MA, Oliveira JV, Treichel H, Oliveira D (2011) Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bio-Proc Biosyst Eng* 34: 145-152
 42. Farias CM, de Souza OC, Sousa MA, Cruz R, Magalh OMC, de Medeiros OV, Moreira KA, de Souza-Motta CM (2015) High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from *Siagrus coronata* (Martius) Becari. *Afr J Biotechnol* 14: 820-828
 43. Ramachandran S, Singh SK, Larroche C, Soccol CR, Pandey A (2007) Oil cakes and their biotechnological applications – a review. *Bioresour Technol* 98: 2000-2009
 44. Ramakrishnan CV, Banerjee BN (1952) Studies on mold lipase. Comparative study of lipases obtained from molds grown on *Sesamum indicum*. *Arch Biochem Biophys* 37: 131-135
 45. Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr CO, Bertolin TE, Vieira Costa JA (2010) Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol* 101: 8308-8314
 46. Dominguez A, Costas M, Longo MA, Sanroman A (2003) A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 25: 1225-1229
 47. Holker U, Hofer M, Lenz J (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 175-186
 48. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 19: 627-662
 49. Maharana A, Ray P (2015) A novel cold-active lipase from psychrotolerant *Pseudomonas* sp. AKM-L5 showed organic solvent resistant and suitable for detergent formulation. *J Mol Catal B: Enzymatic* 120: 173-178
 50. Jaeger KE, Reetz TM (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16: 396-403
 51. Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39: 235-251
 52. Pilarek M, Szweczyk KW, Wrona M (2002) Kierunki i perspektywy zastosowania lipaz. *Biotechnologia* 2: 146-164
 53. Ray A (2012) Application of lipase in industry. *Asian J Pharm Technol* 2: 33-37
 54. Badgujar VC, Badgujar KC, Yeole PM (2017) Immobilization of Rhizomucor miehei lipase on a polymeric film for synthesis of important fatty acid esters: kinetics and application studies *Bio-process Biosyst Eng* 40: 1463-1478
 55. Gutiérrez A, Del Río JC, Martínez AT (2009) Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. *Applied Microbiol Biotechnol* 82: 1005-1018
 56. Gilani SL, Najafpour GD, Heydarzadeh HD, Moghadamnia A (2017) Enantioselective synthesis of (S)-naproxen using immobilized lipase on chitosan beads. *Chirality* 29: 304-314
 57. Verma S, Prakash SK (2014) Isolation, identification and characterization of lipase producing microorganisms from environment. *Asian J Pharm Clin Res* 7: 219-222
 58. Berglund P, Hutt K (2000) Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN (red) *Stereoselective biocatalysis*. Marcel Dekker, New York
 59. Bezborodov AM; Zagustina NA (2014) Lipases in catalytic reactions of organic chemistry. *Applied Biochem Microbiol* 50: 313-337
 60. Nagar M, Dwivedi SK, Shrivastava D (2013) A review on industrial application in microbial lipases. *Int J Pharm Res Sciences* 2: 631-641
 61. Fan X, Niehus X, Sandoval G (2012) Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Method Mol Biol* 861: 471-483
 62. Gandhi NN, Patil NS, Sawant SB, Joshi JB, Wangikar PP, Mukesh D (2000) Lipase – catalyzed esterification, *Cat Rev* 42: 439-480
 63. Sim JH, Khor GK, Kamaruddin AH, Bhatia S (2013) Thermodynamic studies on activity and stability of immobilized *Thermomyces lanuginosus* in producing fatty acid methyl ester (FAME). *Int J Pharm Res Sciences Pub* 3: 2250-3153
 64. Xin JY, Wang Y, Liu T, Lin K, Chang L, Xia CG (2012) Biosynthesis of corn starch palmitate by lipase Novozym 435. *Int J Mol Sciences* 13: 7226-7236
 65. Gopinath CB, Anbu P, Lakshmi Priya T, Hilda A (2013) Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Res Int*, Article ID 154549, str 10

Industrial application of lipases

Renata Banczerz✉

Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, 19 Akademicka St., 20-033 Lublin, Poland

✉ e-mail: renata.banczerz@poczta.umcs.lublin.pl

Key words: lipases, enzyme production, fermentation, industrial application

ABSTRACT

The ability of lipases to perform specific reactions of transformation (biotransformation) makes these enzymes a useful tool used in many syntheses, for example: in the production of detergents, cosmetics, biosurfactants, in the oil-chemical, paper, dairy, food or pharmaceutical industries. Lipases are ubiquitous enzymes but only lipases produced by microorganisms are important for industrial applications due to their wide variety of properties such as stability in organic solvents, action under mild conditions, high substrate specificity and region- and enantioselectivity, as well as the relatively simple methods of their production in fermentors and recovery from the culture medium. This paper reviews the latest achievements in the production of lipases in the submerged fermentation and solid state fermentation using waste products from the agricultural industry. In addition, new applications of lipases were described, including those for the synthesis of biopolymers and biodiesel and for the production of enantiomeric pharmaceuticals, agrochemicals and flavoring compounds.