

# Lipazy grzybowe oraz ich aktywność w reakcjach hydrolizy i syntezy estrów kwasów tłuszczowych

Tadeusz Antczak  
Alina Krystynowicz

Edward Galas  
Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka  
Łódź

## 1. Wstęp

Lipazy (EC 3.1.1.3) zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej zdefiniowano jako hydrolazy estrów glicerolowych (1). Działają one na substraty nierozpuszczalne w wodzie, co decyduje o przebiegu reakcji na powierzchni rozdziału faz z szybkością zależną od wielkości tej powierzchni (2,3). Enzymy hydrolizujące estry innych, niż glicerol alkoholi zaliczono do esteraz (4).

Lipazy grzybów nitkowatych, pod pewnymi względami, zostały poznane lepiej aniżeli lipazy bakterii czy drożdży i znalazły już praktyczne zastosowanie (5). Do produkcji firmowych preparatów lipaz stosuje się najczęściej grzyby rodzajów: *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* (6). Zróżnicowane właściwości lipaz, a w szczególności ich specyficzność substratowa, pH — stabilność, termostabilność, zadecydowały o możliwościach ich wykorzystania w niektórych gałęziach przemysłu spożywczego, chemicznego, farmaceutycznego i innych (7,8).

W środowisku wodnym — na skutek wysokiego stężenia molowego wody — lipaza katalizuje reakcję hydrolizy. Różnica w energii swobodnej Gibbsa, towarzysząca zmianie kierunku reakcji z hydrolizy na syntezę w przypadku lipaz nie jest duża (9,10), dlatego zmieniając środowisko reakcji na niewodne można zmienić kierunek reakcji w stronę syntezy (11,12).

W reakcji enzymatycznej estryfikacji w środowisku solwentów organicznych woda spełnia wyjątkową funkcję. Jest ona zarówno niezbędnym składnikiem środowiska reakcji, jak i jednym z produktów reakcji. Wiadomo, że w środowisku tym enzym jest otoczony molekułami wody nie związanymi kowalencyjnie z powierzchnią białka. Woda ta, nazywana warstwą wody niezbędnej zabezpiecza katalityczną konformację enzymu (13,14). Rozpuszczalnik orga-

niczny, usuwając warstwę wody niezbędnej, może spowodować denaturację enzymu.

Enzymatyczna synteza estrów w porównaniu z syntezą chemiczną wykazuje wiele zalet. Zaliczyć do nich można m.in. wysoką specyficzność syntezy, brak produktów ubocznych i niską energochłonność. Lipazy w środowisku niewodnym katalizują syntezę wielu stereospecyficznych estrów i laktonów, których otrzymywanie i wydzielenie na drodze chemicznej jest zazwyczaj bardzo skomplikowane (15,16).

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Otrzymywanie lipaz

W badaniach stosowano kultury drobnoustrojów wyselekcjonowanych ze środowiska, pochodzące z kolekcji własnej, tj. szczepy *Mucor racemosus* A37, *Aspergillus niger*, *Asp. oryzae* 25, *Penicillium glaucum*, *Rhizopus nigricans*, *M. javanicus* T45 i *Asp. oryzae* 14.

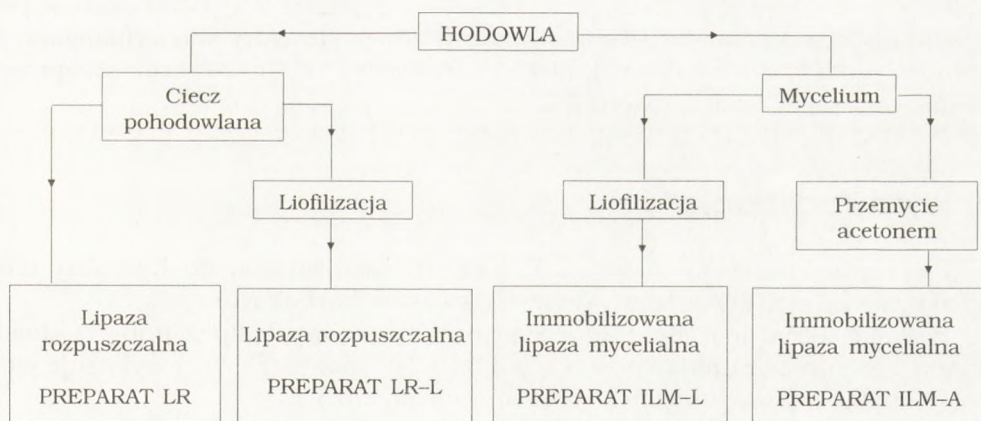
Hodowlę wstrząsaną prowadzono w kolbach o pojemności 500 cm<sup>3</sup> zawierających 50 cm<sup>3</sup> podłoża, w temperaturze 30°C przy obrotach wstrząsarki 220 min<sup>-1</sup>, w czasie 3 dni.

Stosowano następujące podłoża:

I — (%) wytłoki sojowe — 2,0; mocznik — 0,2; sacharoza — 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,1; CaCO<sub>3</sub> — 0,5; olej oliwkowy — 0,5; H<sub>2</sub>O do 100% (17);

II — (%) ekstrakt kukurydziany — 5,0; olej oliwkowy — 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,2; KCl — 0,05; NaNO<sub>3</sub> — 0,05; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,05; H<sub>2</sub>O do 100% (18).

Schemat postępowania prowadzący do otrzymania preparatów lipaz zamieszczono na rys. 1.



Rys.1. Schemat otrzymywania rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych preparatów lipaz.

W wyniku hodowli badanych szczepów uzyskano ciecz pohodowlaną i mycelium, które stanowiły materiał wyjściowy do otrzymywania lipaz pozakomórkowych (rozpuszczalne) i wewnątrzkomórkowych (immobilizowane preparaty mycelialne). Dla każdego szczepu otrzymano cztery różne preparaty lipaz (rys. 1).

Liofilizację preparatów enzymatycznych prowadzono w aparacie firmy Edwards. Odwodnienie biomasy za pomocą acetonu polegało na jej 3-krotnym przemyciu acetonem.

## 2.2. Oznaczanie aktywności hydrolitycznej

Aktywność hydrolityczną ( $A_h$ ) lipaz oznaczano za pomocą metody miareczkowej (19) i wyrażano w  $\mu\text{mol}$  kwasu tłuszczowego uwalnianego w czasie 1 sekundy przez 1  $\text{cm}^3$  cieczy pohodowlanej z 20% emulsji oliwy z oliwek w 2% alkoholu poliwinylowym (pH 7) lub 1 g s.s. preparatu stałego z 40% emulsji trioleinianu glicerolu w 2% alkoholu poliwinylowym (pH 7). Postęp reakcji hydrolizy ( $C_h$ ) określano także w procencie hydrolizy, w przeliczeniu na trioleinian. Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C dla lipaz rozpuszczalnych i 30°C dla immobilizowanych preparatów mycelialnych.

## 2.3. Synteza estrów

Syntezę estrów prowadzono w szczelnie zakrytych naczyniach o pojemności 30  $\text{cm}^3$ , do których wprowadzano 1 mmol kwasu, 1 mmol alkoholu, 5  $\text{cm}^3$  rozpuszczalnika i 50 mg lipazy. Syntezę prowadzono w temperaturze 30°C, przy obrotach wstrząsarki 220  $\text{min}^{-1}$ . Dane uzupełniające dla każdej syntezy umieszczono pod tabelami.

Aktywność syntetyczną ( $A_s$ ) lipaz oznaczano za pomocą metody alkalimetrycznej (18) i wyrażano w molach estru syntezowanego w czasie 1 sekundy przez 1 g s.s. enzymu. Wydajność reakcji estryfikacji ( $C_h$ ) podawano w procencie ubytku kwasu użytego do syntezy. Powstałe estry identyfikowano za pomocą metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (20) oraz przeprowadzając analizę w podczerwieni IR.

## 3. Wyniki i dyskusja

Preparaty lipaz (zob. rozdz. 2.1, (rys. 1)) zastosowano do hydrolizy oleju oliwkowego i syntezy estrów wyższych kwasów karboksylowych.

Badając aktywność hydrolityczną pozakomórkowych lipaz (tab. 1) stwierdzono, że najwyższą aktywność ( $A_h = 3,39 \times 10^{-6} \text{mol} (\text{cm}^3)^{-1} \text{s}^{-1}$ ) wykazuje ciecz po hodowli szczepu *Rhizopus nigricans* na podłożu I.

TABELA 1  
AKTYWNOŚĆ HYDROLITYCZNA LIPAZ POZAKOMÓRKOWYCH (LR)

Podłoża	I	II
Szczep	Aktywność $A_h$	
<i>Mucor racemosus</i> A37	0,49	0,34
<i>Aspergillus niger</i>	0,10	0,03
<i>Asp. oryzae</i> 25	0,16	0,14
<i>Penicillium glaucum</i>	0,10	0,07
<i>Rhizopus nigricans</i>	<b>3,39</b>	0,28
<i>M. javanicus</i> T45	0,19	0,12
<i>Asp. oryzae</i> 14	0,12	0,09

Substrat: 20% emulsja oleju z oliwek.

Tak wysoka aktywność rokuje możliwości praktycznego zastosowania tej lipazy.

Lipazy pozakomórkowe badanych szczepów, rozpuszczone w fazie wodnej środowiska difazowego woda-eter naftowy (1:10 v/v), nie wykazywały aktywności w syntezie estrów kwasu oleinowego.

Po liofilizacji lipazy te zastosowano do syntezy estrów w środowisku eteru naftowego (tab. 2).

TABELA 2  
WYDAJNOŚĆ SYNTEZY ESTRÓW PRZEZ LIPAZY ROZPUSZCZALNE,  
ODWODNIONE METODĄ LIOFILIZACJI (LR-L)

Kwas alkohol	Palmitynowy		
	etanol $C_s$ [%]	1-heksanol $C_s$ [%]	oleinowy $C_s$ [%]
<i>Mucor racemosus</i> A37	20,3	6,2	5,1
<i>Aspergillus niger</i>	6,5	9,4	6,2
<i>Asp. oryzae</i> 25	5,0	21,8	9,5
<i>Rhizopus nigricans</i>	4,0	16,6	8,3
<i>Mucor javanicus</i> T45	53,7	16,1	18,7
<i>Penicillium glaucum</i>	0	0	0

Jako rozpuszczalnik używano eter naftowy. Do próby dodawano 2g sita molekularnego 4Å. Czas reakcji wynosił 18 godzin.

Jedynie lipaza *Penicillium glaucum* nie wykazywała aktywności syntetycznej. Pozostałe z badanych lipaz, a w szczególności lipazy *Mucor*, katalizowały syntezę estrów.

Wydajność syntezy estrów dla lipaz wewnątrzkomórkowych otrzymanych w formie liofilizowanego mycelium badanych szczepów (ILM-L) zamieszczono w tab. 3.

TABELA 3  
WYDAJNOŚĆ SYNTEZY ESTRÓW PRZEZ IMMOBILIZOWANE LIPAZY MYCELIALNE,  
ODWODNIONE ZA POMOCĄ METODY LIOFILIZACJI (ILM-L)

Kwas szczep	Palmitynowy					Stearynowy					Oleinowy				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
alkohol	wydajność [%]														
etanol	93	40	57	80	92	74	23	48	22	70	91	36	42	51	94
1-propanol	90	33	50	53	83	78	20	66	40	80	97	31	40	42	96
2-propanol	26	10	22	23	33	31	10	40	16	33	38	9	15	12	36
2-metylo-1-propanol	98	53	92	91	97	70	13	28	4	91	85	16	22	60	89
2-metylo-1-butanol	96	16	58	33	88	73	7	71	31	77	93	18	45	28	92
2-pentanol	30	16	28	20	25	31	18	22	15	28	28	12	16	8	32
2-metylo-2-butanol	7	0	2	0	9	5	0	2	0	8	3	0	1	0	8
1-heksanol	93	33	30	80	85	90	38	50	20	83	94	16	12	32	98
oleinowy	81	43	58	23	92	83	20	53	22	87	91	23	30	12	90
benzylowy	89	17	43	30	80	86	8	45	20	78	92	16	19	15	83
sorbitol	13	0	0	0	7	10	0	0	0	13	11	0	0	0	8
glicerol	29	8	15	16	23	38	4	25	19	39	48	16	8	4	49

Jako rozpuszczalnik użyto eter naftowy odwodniony sitem molekularnym 4Å, do próby dodawano 2 g tego sita. Czas reakcji wynosił 18 godzin.

1 — *Mucor racemosus* A37, 2 — *Asp. niger*, 3 — *Asp. oryzae* 25, 4 — *Rhizopus nigricans*, 5 — *M. javanicus* T45.

Najwyższą wydajność reakcji stwierdzono, tak jak w poprzednim eksperymencie, dla lipaz *Mucor*. Ich preparaty syntetyzowały estry następujących kwasów tłuszczowych: palmitynowego, oleinowego i stearynowego oraz pierwszorzędowych alkoholi alifatycznych (C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>) z wydajnością 70-98%. Syntetyzowały także estry alkoholi drugorzędowych, ale z niższą wydajnością (25-38%), a także estry trzeciorzędowego alkoholu 2-metylo-2-butanolu z wydajnością 3-9%, glicerolu — z wydajnością 23-49% oraz sorbitolu z wydajnością 7-13%.

Nie stwierdzono wyraźnych różnic w aktywności wykazywanej przez preparaty mycelialne w środowisku eteru naftowego nasyconego wodą, a osuszonego sitem molekularnym 4Å. Preparaty mycelialne zawierały ok. 3% wody, co jest zapewne wartością optymalną.

Aktywność syntetyczną preparatów mycelialnych — liofilizowanych i odwodnionych acetonem porównano w tab. 4.

TABELA 4

WPLYW SPOSOBU ODWODNIENIA MYCELIUM NA AKTYWNOŚĆ SYNTETYCZNĄ IMMOBILIZOWANYCH W NIM LIPAZ

Lipaza	Masa (g)	Aktywność $A_s$	Aktywność ogólna $A_s \times g$	Stopień oczyszczenia	Wydajność procesu (%)
<i>M. javanicus</i> T45					
preparat ILM-L	1,900	1,67	3,17	1,0	63,7
preparat ILM-A	1,194	4,17	4,98	2,5	100,0
<i>M. racemosus</i> A37					
preparat ILM-L	1,820	1,11	2,02	1,0	46,9
preparat ILM-A	1,200	3,61	4,31	2,1	100,0

Substraty: kwas oleinowy i 1-propanol w środowisku eteru naftowego. Do prób dodawano 2 g sita molekularnego 4Å. Czas reakcji 1 godzina.

$$A_s = x \text{ mol g}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^{-6}$$

Stwierdzono, że przemycie mycelium acetonem zwiększyło syntetyczną aktywność właściwą otrzymanych lipaz około 2-krotnie w porównaniu z preparatami uzyskanymi na drodze liofilizacji.

Wzrost aktywności właściwej immobilizowanych preparatów mycelialnych jest wynikiem usunięcia przez aceton lipidów i białek ściany komórkowej oraz wewnątrzkomórkowych inhibitorów, co znacznie ułatwia dyfuzję substratów i produktów oraz zwiększa aktywność lipaz. Do przemywania używano acetonu o temperaturze od  $-25^\circ\text{C}$  do  $25^\circ\text{C}$ . Zaobserwowano tylko niewielkie różnice w aktywności ogólnej na korzyść preparatów acetonowych otrzymywanych w niskiej temperaturze. Ponieważ różnice te były niewielkie, w badaniach rutynowych przemywano próby grzybni acetonem o temperaturze pokojowej.

Aktywność hydrolityczną i syntetyczną immobilizowanych lipaz mycelialnych (ILM-A), otrzymanych z *M. javanicus* T45 i *M. racemosus* A37 prezentowana jest w tab. 5.

TABELA 5

AKTYWNOŚĆ IMMOBILIZOWANYCH LIPAZ MYCELIALNYCH

(ODWODNIONYCH ACETONEM ILM-A)

W REAKCJI HYDROLIZY TRIOLEINIANU GLICEROLU I SYNTEZY OLEINIANU PROPYLU

Masa (g)	<i>Mucor javanicus</i> T45				<i>Mucor racemosus</i> A37			
	$A_h$	$C_h$	$A_s$	$C_s$	$A_h$	$C_h$	$A_s$	$C_s$
0,01	8,19	4,82	15,08	54,31	15,50	9,1	13,29	47,87
0,02	6,61	7,78	8,86	63,82	12,97	15,31	7,40	53,30
0,05	7,78	22,92	4,06	73,01	12,50	36,86	3,46	62,21
0,10	7,47	44,04	2,76	99,20	9,47	55,82	2,11	76,11
0,15	7,97	70,36	1,84	99,41	10,33	91,27	1,84	99,50

**Hydroliza:** Substrat: 40% emulsja trioleinianu glicerolu.

$A_h$ - aktywność hydrolityczna ( $\text{mol g}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^{-6}$ ),

$C_h$ - wydajność hydrolizy (%).

**Synteza:** Rozpuszczalnik — eter naftowy. Do prób dodawano 2g sita molekularnego 4Å. Czas reakcji 1 godzina.

$A_s$  - aktywność syntetyczna ( $\text{mol g}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^{-6}$ ),

$C_s$  - wydajność syntezy (%).

Lipazy *Mucor* wykazują zarówno aktywność hydrolityczną, jak i syntetyczną. Wypadkowy kierunek procesu katalizy jest wymuszany warunkami środowiska reakcji.

Stwierdzono, że szybkość syntezy oleinianu propylu i szybkość hydrolizy trioleinianu glicerolu jest bardzo zbliżona, mimo że poddawano hydrolizie i syntezie estry różnych alkoholi. Prawdopodobnie fragmentem substratu rozpoznawanym przez lipazę jest część kwasowa estru, która w obu przypadkach była taka sama. Zwiększenie różnic w szybkości reakcji hydrolizy i syntezy, które zaobserwowano dla większych naważek lipazy wynikało prawdopodobnie z różnych proporcji molowych substratów. W reakcji syntezy stosowano proporcję molową kwasu do alkoholu, jak 1:1. W reakcji hydrolizy proporcje molowe estru do wody wynosiły jak 1:60.

Dynamikę nagromadzenia oleinianu propylu w reakcji syntez, katalizowanej przez lipazy *M. javanicus* T45 i *M. racemosus* A37 przedstawiono w tab. 6.

TABELA 6  
DYNAMIKA NAGROMADZANIA OLEINIANU PROPYLU W REAKCJI SYNTAZY  
KATALIZOWANEJ PRZEZ IMMOBILIZOWANE LIPAZY MYCELIALNE ODWODNIONE ACETONEM (ILM-A)

Czas (min)	<i>Mucor javanicus</i> T45				<i>Mucor racemosus</i> A37			
	z sitem 4Å		bez sita		z sitem 4ę		bez sita	
	( $C_s$ )	( $A_s$ )	( $C_s$ )	( $A_s$ )	( $C_s$ )	( $A_s$ )	( $C_s$ )	( $A_s$ )
5	—	—	2,9	1,93	—	—	6,6	4,40
10	34,8	11,60	4,8	1,60	34,8	11,60	3,8	1,27
15	—	—	2,9	0,64	—	—	2,0	0,44
20	36,5	6,08	13,0	2,17	39,0	6,50	12,1	2,02
25	—	—	11,2	1,49	—	—	18,6	2,48
30	49,0	5,44	22,2	2,47	44,8	5,00	17,6	1,96
35	—	—	23,1	2,20	—	—	18,7	1,78
40	57,5	4,79	18,5	1,54	51,5	4,29	16,7	1,39
45	—	—	20,3	1,50	—	—	20,3	1,50
50	63,1	4,21	21,3	1,42	58,2	3,88	22,2	1,48
55	—	—	24,9	1,51	—	—	25,8	1,54
60	72,3	4,02	29,5	1,61	62,3	3,48	26,8	1,49
120	85,7	2,38	—	—	80,3	2,23	—	—
480	—	—	80,8	0,22	—	—	76,9	0,21

Substraty: kwas oleinowy, 1-propanol. Rozpuszczalnik — eter naftowy. Do prób z pochłaniaczem wody dodawano 2 g sita molekularnego 4Å.

$A_s$  — aktywność syntetyczna ( $\text{mol g}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^{-6}$ ),

$C_s$  — wydajność syntezy (%).

Dla reakcji prowadzonej bez pochłaniacza wody, w początkowym okresie

(do 40 min) zaobserwowano niewielkie wahania wydajności syntezy oleinianu propylu. Dynamika syntezy w tym okresie była wypadkową szybkości dyfuzji substratów i produktów z mycelium. Szybkość tworzenia wody w komórkach *Mucor* była większa od szybkości jej dyfuzji, co w konsekwencji prowadziło do lokalnego zalegania powstałej wody, stwarzając tym samym środowisko preferujące reakcję hydrolizy powstałego estru. W przypadku reakcji biegnącej z pochłaniaczem wody zjawisko przejściowego zalegania wody w mycelium nie występowało, na skutek wymuszonej różnicą stężeń ciągłej dyfuzji wody z komórki. Bez udziału pochłaniacza wody reakcja przebiegała wolniej. Było to niewątpliwie wadą tego sposobu reakcji.

Woda wydzielona w procesie syntezy, zwłaszcza dla wysokiego stężenia wyjściowego substratów, spowalnia proces syntezy. Można temu zaradzić prowadząc syntezę estru w wielostopniowych reaktorach kolumnowych. Parametry syntezy są tak dobrane, że ilość wody wydzielonej w każdym reaktorze nie powoduje zmiany kierunku reakcji. Mieszanina substratów i produktów przed wprowadzeniem do następnego reaktora jest odwadniana, co zapewnia wysoką produktywność całego procesu (21).

Dobór rozpuszczalnika, w którym przebiega enzymatyczna estryfikacja jest jednym z najważniejszych czynników, wpływających na wydajność syntezy estrów. W poprzedniej pracy (22), badając termostabilność lipazy *Mucor javanicus* w temperaturze 100°C w środowisku niewodnym stwierdziliśmy, że alkohole rozpuszczane w wodzie inaktywują enzym, natomiast reakcja prowadzona w środowisku alkoholi mieszających się z wodą w stopniu ograniczonym (nawet w tak wysokiej temperaturze) pozwala zachować aktywność katalityczną lipazy. Wynikało to prawdopodobnie z trwałego, denaturującego lipazę odkształcenia warstwy wody niezbędnej, polegającego na przejściu do roztworu molekuł wody zabezpieczającej katalityczną konformację biokatalizatora w środowisku organicznym (14).

Synteza glicerydów kwasów: stearynowego, oleinowego i palmitynowego (tab. 7), katalizowana przez lipazy *Mucor* przebiega z najwyższą wydajnością w obecności eteru diamylowego ( $\text{Log } P = 3,9$ ). Zależność  $A=f(\text{log}P)$  (gdzie  $A$  to wydajność syntezy estru, a  $P$ -polarność rozpuszczalnika) w tym punkcie wykazuje maksimum. Poprzednio stwierdziliśmy (22), że w przypadku syntez oleinianu butylu i stearynianu propylu, katalizowanych przez lipazę *Mucor javanicus* T45, zależność ta wykazuje także maksimum. Rozpuszczalnikiem preferowanym dla tych syntez był eter naftowy ( $\text{log } P = 3,2$ ).

Występowanie maksimum aktywności w zależności od polarności rozpuszczalnika stanowiącego środowisko reakcji, stwarza możliwość dalszej optymalizacji tego środowiska reakcji, np. z wykorzystaniem mieszaniny rozpuszczalników (16).



TABELA 7  
DOBÓR ROZPUSSZCZALNIKA DO SYNTEZY GLICERYDÓW

Rozpuszczalnik	Log P (15)	Wydajność estryfikacji (%)			
		<i>Mucor javanicus</i>			<i>Mucor racemosus</i>
		A	B	C	A
DMSO	-1,3	0	0	0	0
dioksan	-1,1	0	0	0	0
2,4-pentandion	-0,6	0	0	0	0
aceton	-0,23	10,0	8,2	10,8	7,3
chlorek metylenu	1,3	10,8	12,3	14,4	0
butyloetyloeter	1,9	0	9,9	17,5	0
chloroform	2,0	12,2	9,0	25,5	8,2
benzen	2,0	22,7	15,3	20,3	18,6
trójchloroetylen	2,2	26,8	25,5	24,7	16,6
toluen	2,5	19,6	8,0	4,5	6,0
cykloheksan	3,2	25,3	23,3	8,7	21,2
eter naftowy	3,2	25,7	18,8	10,3	12,7
heksan	3,5	23,0	23,5	4,8	22,1
diamyloeter	3,9	55,0	36,9	42,2	24,2
n-heptan	4,0	36,7	21,6	19,0	26,4
izooktan	4,5	37,6	24,1	13,8	38,0
dodekan	6,6	26,8	17,8	4,6	15,1
n-heksadekan	8,8	12,44	29,4	22,6	8,6

A — kwas stearynowy,

B — kwas oleinowy,

C — kwas palmitynowy,

Lipaza ILM-A, czas 20 godzin.

## Literatura

1. *Enzyme nomenclature*, (1984), Ed. Webb E.C., Academic Press, INC, London.
2. Entressangles B., Desnuelle P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 285-291.
3. Brockerhoff H., Jensen G., (1974), *Lipolytic enzymes*, London.
4. Lestrowaia N. N., (1976), *Usp. Mikrobiologii*, 11, 21-38.
5. Seitz E. W., (1974), *JAOCS*, 2, 12-17.
6. Ruban E. L., (1977), *Mikrobnije lipidy i lipazy*, Nauka, Moskwa.
7. Antczak T., Krystynowicz A., Galas E., (1989), *Kosmos*, 8, 95-110.
8. Lazar von G., Henkel K., (1985), *Fette Seifen Anstrichmittel*, 10, 394-400.
9. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513-516.
10. Kastie J. H., Loevenhart A. S., (1982), *Amer. Chem. J.*, 24, 491-496.
11. Khmielnicki Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K., (1988), *Biotechnologia*, 4, 292-308.
12. Antczak T., (1991), *Biotechnologia*, 1(11), 62-70.

13. Laane C., (1987), *Biocatalysis*, 1, 17-22.
14. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87.
15. *Progress in Biotechnology*, vol. 8, *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (1992), Eds. Tramper J., Vermue M. H., Beefting H. H., van Stockar U., Elsevier, Amsterdam.
16. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.
17. Krystynowicz A., Galas E., (1987), *Przemysł Ferment. Owoc. Warz.*, 2, 28-30.
18. Blain J. A., Patterson J. D. E., Shaw C. E., Akhtar M. W., (1976), *Lipids*, 11, 553-560.
19. Arends I. M., Dorocho W. W., Gonczarow J. I., Swierczkova T. M., (1979), *Prikl. Bioch. Mikrob.* 15, 676-685.
20. Okumura S., Iwai M., Tsujisaka Y., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, 575, 156-165.
21. Knox T., Cliffe K. R., (1984), *Proces Biochemistry*, October, 188-192.
22. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 1 (20), 59-67.

### Fungus lipases and their activity in the hydrolysis reaction and in the synthesis of fatty acid esters

#### Summary

Preparations of soluble and immobilized fungus lipases showing high catalytic activity in hydrolysis of acyloglycerols in water, synthesis of esters of higher fatty acids in hydrolysis of acyloglycerols in water and synthesis of esters of higher fatty acids in organic solvents milieu were obtained.

The course of reaction and the activity depended on: the lipase source, the form of enzyme and the reaction milieu. The studied extracellular lipases, in a water — soluble form (especially *R. nigricans* lipase), exhibited high activity in olive oil hydrolysis. The lipases were not active in esters synthesis in diphase system: water-organic solvent. Being drained by liophilization they demonstrated the activity in esters synthesis in organic solvents milieu.

The endocellular lipases immobilized *in situ* showed the highest activity in the synthesis of esters in organic milieu. These enzymes can also be used for hydrolysis of acyloglycerols.

The obtained liquid and immobilized mycelial preparations demonstrate activity which qualifies them for industrial scale application.

#### Key words:

fungal lipases, ester hydrolysis, ester synthesis, organic solvents.

#### Adres dla korespondencji:

Tadeusz Antczak, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.