

# Enzymatisk modifikation af phospholipider

**Enzymkatalyserede reaktioner i organiske solventer har utallige potentielle anvendelser. De kan f.eks. bruges til at modificere fedtsyresammensætningen i phospholipider ved at forbedre fysiske og kemiske egenskaber såsom emulgatoregenskaber og oxidationsstabilitet**

*Af Anders Falk Vikbjerg og Xuebing Xu, Food Biotechnology and Engineering Group, BioCentrum-DTU, DTU*

I en lang række projekter på BioCentrum-DTU under Levnedsmiddelcentret (LMC) i Food Biotechnology and Engineering Group arbejdes der på vha. enzymteknologi at udvikle nye produkter og teknologier inden for lipidområdet. Ud over lipidmodifikation er oprensning af lipider og separationsprocesser en del af forskningsområdet.

Anvendelse af enzymer til modifikation af lipider har flere fordele sammenlignet med kemisk syntese. Enzymatiske reaktioner giver ofte færre biprodukter, da enzymerne er meget specifikke i deres katalytiske aktivitet, og de kan bruges til både hydrolyse- og syntesereaktioner. Forskellige enzymreaktorer og -processer har i forskellig skala inkl. batchreaktorer og pakkede kolonner været anvendt til produktion af diverse lipidprodukter. Faciliteter på BioCentrum muliggør opskalering af processer fra laboratorie- til pilotskala.

Et af de igangværende projekter er enzymkatalyseret produktion af phospholipider med ændret fedtsyreprofil (strukturerede phospholipider). Phospholipider bruges bl.a. som emulgatorer i levnedsmiddelprodukter, som liposomer i den farmaceutiske industri og som lotioner i kosmetikindustrien.

Indtil nu har der været relativt få forsøg på at optimere de funktionelle egenskaber ved at ændre fedtsyresammensætningen.

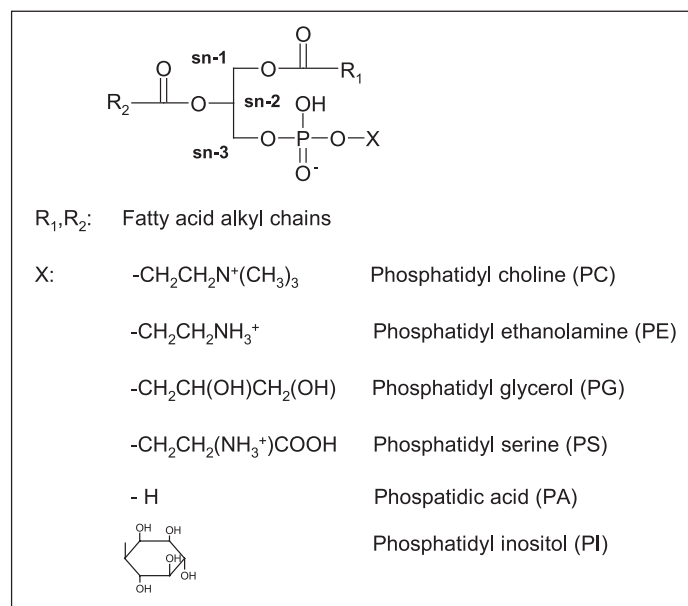
## Phospholipidkemi og -anvendelser

Phospholipider (PL) inddeles normalt i to grupper: glycerophospholipider og sphingophospholipider. Glycerophospholipider har den største kommercielle anvendelse i form af lecitin (blanding af glycerophospholipider). Figur 1 viser de kemiske strukturer af glycerophospholipider. I glycerophospholipider er rygraden i molekylet glycerol, der via to esterbindinger er koblet med to fedtsyrer på sn-1- og sn-2-positionen. På sn-3-positionen ses en phosphorsyrerest, der oftest er forsynet med en substituent. Hovedparten af industrielt anvendt lecitin er et biprodukt fra sojaolieproduktionen og består primært af phosphatidylcholin (PC). Phospholipiderne fjernes fra den rå olie ved en aflecitineringsproces (degumming). Dette skyldes, at deres stærkt emulgerende egenskaber og reaktioner under opvarmning vil mørkfarve olien under forarbejdning. Sojalecitin til sættes normalt til levnedsmidler som margarine, bagværk, chokolade, overtræk på konfekt og diverse mælkeprodukter, hvor de fungerer som emulgatorer. I de fleste tilfælde er kun små mængder (<2%) phospholipid nødvendig.

Phosphatidylcholin har en vigtig rolle i human cellefunktion og menes at være forbundet med en lang række helbredsmæssige egenskaber. Det er en kilde til cholin, som også findes i neu-

rotransmitteren acetylcholin, der er nødvendig for normal hjernefunktion. Derfor har phosphatidylcholin været brugt i studier af neurologiske og psykiske sygdomme [1].

Phospholipiderne har efterhånden fået større anvendelse i lægemiddelindustrien, da de har vist sig i form af liposomer at være velegnede som »drug carriers«. Når phospholipiderne



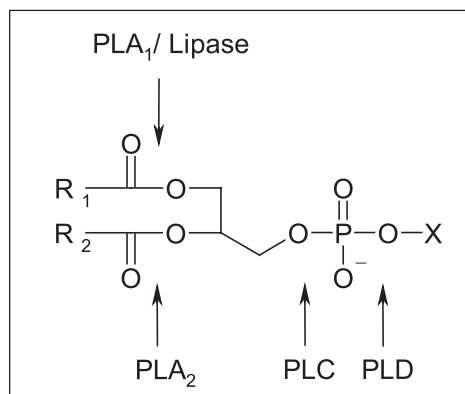
Figur 1. Struktur af naturlige glycerophospholipider.  $R_1$  og  $R_2$  refererer til fedtsyrer og  $x$  refererer til en substituent bundet til en phosphatgruppe.

blandes i en vandig opløsning, finder de sammen og danner liposomer. Liposomer har form som hule skaller, der af sig selv finder sammen og folder sig til runde mikroskopiske sfærer [2]. Der findes allerede godkendte og markedsførte medicinske liposomer, som kan lastes med diverse lægemidler og sendes ind i blodbanen [3].

## Hvorfor udskifte fedtsyrerne i phospholipider?

Fedtsyrerne i naturligt forekommende phospholipider varierer i kædelængde ( $\text{C}_{12}$ - $\text{C}_{22}$ ) og mætningsgrad (antal dobbeltbindinger på fedtsyrerne). Interessen for at ændre på phospholipidernes struktur er stigende. Strukturændringer resulterer i ændret funktionalitet. Ved udveksling af fedtsyrerne er det muligt at forbedre fysiske og kemiske, ernæringsmæssige, farmaceutiske og medicinske egenskaber. Især inkorporering af polyumættede

fedtsyrer fra fiskeolie har af helbredsmæssige grunde fået øget opmærksomhed. Desuden har disse PL vist potentiale i behandling af kræft [4]. De naturligt forekommende polyumættede fedtsyrer kan også udskiftes med mættede fedtsyrer for at øge den oxidative stabilitet i eksempelvis emulsioner [5]. Når valproinsyre (antiepileptika) ved kemisk syntese indsættes på



Figur 2. Hydrolytisk aktivitet af forskellige phospholipider og lipaser. PLA<sub>1</sub>, phospholipase A<sub>1</sub>; PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>; PLC, phospholipase C og PLD, phospholipase D.

phospholipidernes sn-2-position, bliver lægemidlerne mere effektive ved lavere koncentrationer, sammenlignet med de mængder der normalt anvendes [4]. De lavere koncentrationer reducerer de toksikologiske risici og nedsætter risikoen for interaktion med andre lægemidler. Højere koncentrationer af phospholipidnedbrydende enzymer ses oftest ved epilepsi, smerter, migræne og i kræftceller [2,4].

### Enzymatisk modifikation af phospholipider

Adskillige enzymer kan bruges til at modificere phospholipider (figur 2). Lipaser, phospholipase A<sub>1</sub> og A<sub>2</sub> anvendes ved enzymatisk udskiftning af fedtsyrerne i phospholipiderne. Phospholipase A<sub>1</sub> og lipaser hydrolyserer esterbindingen i sn-1-positionen, mens phospholipase A<sub>2</sub> hydrolyserer esterbindingen i sn-2-positionen. Alternativt kan den polære gruppe på phospholipidernes sn-3-position modificeres med phospholipase C og D.

Industrielle enzymer som lipaser produceres ved fermentering af mikroorganismer, mens phospholipaser findes i gift fra slanger, edderkopper, og bier. Kommercielt phospholipase A<sub>2</sub> er hovedsageligt oprenset fra svinebugspytkirtler. Af processens hensyn er det mest hensigtsmæssigt at anvende immobiliserede enzymer, da det muliggør genanvendelse og letter separationen af enzym fra det ønskede produkt. Af de omtalte enzymer er det kun lipaser, der på nuværende tidspunkt kan købes på immobiliseret form.

### Industriel enzymatisk modifikation af phospholipider

Adskillige udenlandske firmaer bruger enzymkatalyseret produktion af lysophospholipider (lysoPL) - heriblandt Degussa og Loders Crocklaan [7-8].

LysoPL er en delvist hydrolyseret phospholipid med en fedtsyre. LysoPL kan have fedtsyrer på sn-1- eller sn-2-positionen. Hydrolyse af PL med PLA<sub>2</sub> giver lysoPL med fedtsyrer på sn-1-positionen, og hydrolyse med PLA<sub>1</sub> eller sn-1,3-specifikke lipaser danner lysoPL med fedtsyrer på sn-2-positionen. LysoPL bruges i en lang række levnedsmidler, kosmetikprodukter og medicinal-

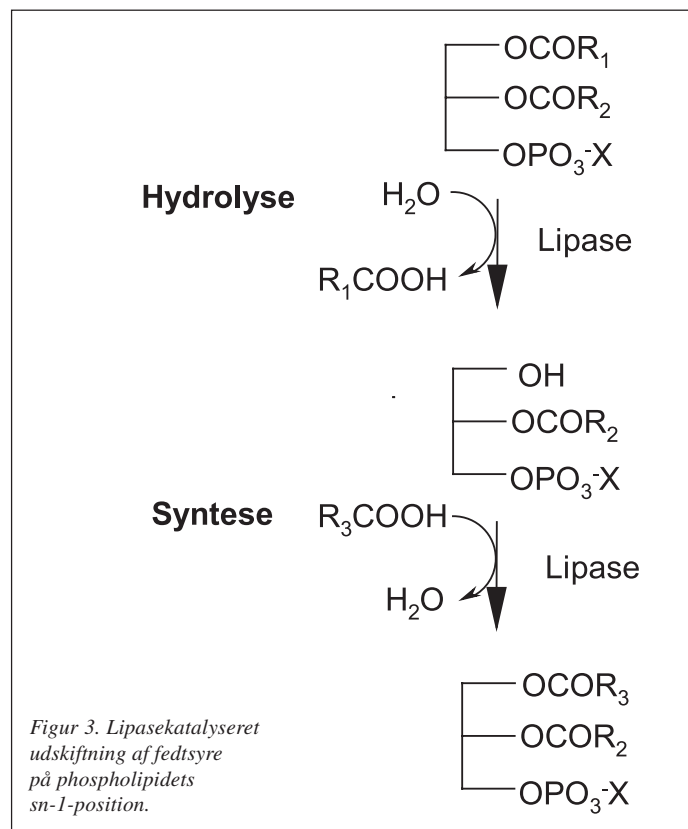
varer. Stofferne er mere hydrofile, har i visse tilfælde bedre emulgatoregenskaber ved lavt pH, højere saltkoncentrationer og højere temperaturer end det oprindelige PL-materiale [9].

Udskiftning af fedtsyrerne kan ske i et eller to trin. I den to-trins lipasekatalyserede proces fjernes den oprindelige fedtsyre på sn-1-positionen ved hydrolyse. Lysophospholipiderne isoleres, og i andet trin esterificeres de med den ønskede fedtsyre. I ettrins-processen sker hydrolyse og esterificering samtidig. At udføre reaktionerne i to trin giver produkter med højere renhed, da ettrins-processen giver produkter med en blanding af de oprindelige og de ønskede fedtsyrer. I ettrins-reaktionen tilsættes høje mængder af den ønskede fedtsyre for at udkonkurrere de oprindelige fedtsyrer. Indtil nu har esterificeringsreaktionerne kun været udført i lille skala, og udfordringerne ligger i at optimere processerne til potentiel industriel anvendelse.

### Problemer og udfordringer

Ved enzymkatalyseret udskiftning af fedtsyrerne i phospholipiderne ses normalt et fald i udbyttet ved stigende inkorporering af nye fedtsyrer [10]. Det skyldes hovedsageligt sideløbende hydrolyse i reaktionssystemet. Det er vigtigt at overveje enzyemmængde, fedtsyremængden, vandindhold/vandaktivitet, mængde af solvent, reaktionstemperatur og -tiden. Hydrolyse- og syntesereaktionerne påvirkes forskelligt af de omtalte parametre, og det er muligt at optimere reaktionssystemet, så der opnås både høj inkorporering af nye fedtsyrer og højt udbytte af phospholipiderne.

Den enzymkatalyserede udskiftning af fedtsyrerne på phospholipiderne har hovedsageligt været udført med lipaser og



Figur 3. Lipasekatalyseret udskiftning af fedtsyre på phospholipidets sn-1-position.

AAS · ICP/MS  
UV-VIS · LC/MS  
GC/MS · FT-IR/NIR

**HPLC/GC kolonner?**  
**- Så er det også os!**

**Thermo**  
ELECTRON CORPORATION  
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

phospholipase A<sub>2</sub> ved tilstedeværelse af organiske solventer såsom n-hexan og toluen [10]. Alternativt anvendes der et solventfrit system, hvor fedtsyrerne ud over at fungere som acyldonor også fungerer som opløsningsmiddel. Brugen af solventer øger reaktiviteten pga. lavere viskositet og øget massetransport. Solventets polaritet har stor betydning for enzymets katalytiske aktivitet. Høj polaritet fjerner bundet vand fra enzymet, hvorefter den katalytiske aktivitet sænkes [11]. Optimering af solvent og solventfrit system er udført i vores laboratorium, og begge systemer giver omtrent samme udbytte under optimerede betingelser. Dog påvirker de omtalte parametre systemerne meget forskelligt. I et solventfrit system ses inhibering ved høje mængder frie fedtsyrer, mens dette ikke er tilfældet i solventsystemet. Store mængder fedtsyrer vanskeliggør den efterfølgende oprensning. Andre problemer er, at det normalt er nødvendigt at have store enzymmængder for effektivt at inkorporere nye fedtsyrer. Ved høje enzymdoser (>50 vægt% baseret på substratmængde) har reaktionsblandingen svært ved at blande, især i det solventfrie system.

Vand opretholder enzymets struktur i reaktionssystemet, og samtidig har det indflydelse på reaktionshastigheden, produktudbyttet og enzymets stabilitet. For høje mængder vand fører i solventsystemet til øget hydrolyse, mens det i det solventfrie system fører til inhibering af syntese- og hydrolysereaktionerne. Mættede saltopløsninger har sædvanligvis været brugt til at regulere vandaktiviteten i laboratorieforsøg. Det er ikke praktisk ved opskaleret produktion, og der skal udtænkes nye, alternative metoder til at kontrollere vandindholdet i systemet.

Temperaturen er også en vigtig parameter ved enzymatisk udveksling af fedtsyrerne. Substraternes viskositet reduceres ved høje temperaturer, hvilket resulterer i øget massetransport og derved øget reaktionshastighed. Reaktionstemperaturer skal dog vælges efter enzymernes termostabilitet. Ved for høje temperaturer denaturerer enzymet irreversibelt, hvilket reducerer dets præstation.

Selv om brugen af organiske solventer har gjort enzymatisk acylmodifikation af phospholipider mere realiserbar, er der stadig opgaver, der skal løses for at reaktionerne kan blive kom-

mercielt attraktive i større skala. Reaktionsparametrene skal vælges med omhu, ellers vil sideløbende hydrolyse i systemet resultere i lavt udbytte.

*Det omtalte ph.d.-projekt er finansieret af Statens Teknisk-Videnskabelige Forskningsråd, og projektleder er lektor Xuebing Xu. Hovedmålene med projektet er at belyse reaktionssystemer og udvikle nye processer til produktion af strukturerede phospholipider til potentiel industriel anvendelse. Et antal videnskabelige artikler er i forbindelse med projektet blevet publiceret eller indsendt til diverse tidsskrifter. Under ledelse af lektor Xuebing Xu er andre nye projekter om modifikation af phospholipider ved anvendelse af enzymteknologi blevet igangsat.*

E-mail-adresse

Anders Falk Vikbjerg: afv@biocentrum.dtu.dk

#### Referencer:

1. Farooqui, A.A.; Horrocks, L.A.; Farooqui, T. (2000): Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders, *Chem. Phys Lipids* 106,1
2. <http://www.liplosome.com>
3. Lægemiddelkataloget: <http://www.lk-online.dk>
4. Kozak, A. (2001): Phospholipid derivatives of valproic acid and mixtures thereof, US patent 6,313,106.
5. Jenski, L.J., Zerouga, M., Stillwell, W. (1995): Omega-3 fatty acid-containing liposomes in cancer therapy, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 210:227
6. Pedersen, K.B. (2001): Interesterification of phospholipids, US patent 6,284,501
7. <http://www.degussa-food-ingrdients.com>
8. <http://www.croklaan.com>
9. Colarow, L., Masson, G., Trueck, H.U., Heat-stable oil and water emulsion and preparation thereof, US patent 5,314,706
10. Adlercreutz, P., Lyberg, A.-M., Adlercreutz, D. (2003): Enzymatic fatty acid exchange in glycerophospholipids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105:638.
11. Klibanov, A.M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, 49:241.

## Patentinformation:

### Indien har ændret sin patentlovgivning

I forlængelse af vores note om Indien i Dansk Kemi nr. 1 kan vi berette, at den indiske regering netop har vedtaget en ændring af patentlovgivningen. Det får bl.a. konsekvenser for patentering af lægemidler og kemiske produkter i Indien. Ændringen betyder, at Indiens patentlovgivning nu lever op til de internationale WTO-regler, og det hilses velkommen af en række af de store farmaceutiske virksomheder, der opererer i Indien. Regeringen har dog fortsat udstrakte beføjelser til at kunne tilsidesætte patentrettigheder i spørgsmål, der vedrører den indiske befolknings sundhed.

Selve lovændringen gør det muligt at opnå patent på farmaceutiske produkter. Tidligere har det kun været muligt at få patent på fremgangsmåder inden for det farmaceutiske felt, og ændringen er dermed et stort skridt fremad.

En anden vigtig ændring er, at den indiske regering nu kan udstede tvangslicenser, hvis en patenthaver bruger sit patent til at hindre, at et givent produkt bliver produceret og kommer på markedet i Indien eller sågar produceret og eksporteret til et andet land, hvor den offentlige sundhed er truet. Der er dog desværre fortsat nogen uklarhed om, præcis hvordan reglerne om tvangslicenser vil blive forvaltet.

### Integra LifeSciences mod Merck

I USA skal højesteret nu høres i appelsagen om en afgørelse fra

juni 2003, hvor retten afgjorde, at såkaldt »research exemption« ikke eksisterer i USA.

I Europa sikrer »research exemption«, at eksperimenter, der foretages i et forskningsforløb, hvor man identificerer nye lægemiddelsammensætninger til brug i kliniske studier, kan undtages f.s.v. angår krænkelse af eksisterende patentrettigheder.

Sagen Integra Lifesciences mod Merck blev rejst, fordi Integra ejer en patentfamilie, de såkaldte »RGD-patenter«, der relaterer til et tripeptidsegment af fibronectin med sekvensen Arg-Gly-Asp (det såkaldte »RGD-peptid«).

Samtidig indgik Merck en aftale med Scripps om, at Scripps forskere skulle identificere potentielle lægemiddelkandidater, som kan hæmme angiogenese. Finansieringen skulle Merck stå for.

Forskerne hos Scripps udførte herefter en række eksperimenter, hvor de identificerede og screenede mulige lægemiddelkandidater, hvoraf nogle altså lå inden for Integras RGD-patenter. Herefter fulgte sagsanlægget mod Merck og Scripps. Første runde gav Integra medhold i, at Merck og Scripps krænkede Integras RGD-patenter, idet retten ikke anerkendte »research exemption« i USA.

Der forventes en afgørelse på anden og sidste runde i slutningen af juni i år, og det bliver spændende at se, om USA's Højesteret lader den oprindelige afgørelse stå.

**Plougmann & Vingtoft**

Steen Østergaard, e-mail: sto@pv.dk