



**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**Chemijos fakultetas**

Biochemijos magistrantūros studijų programos II kurso studentas  
Simas Kazlauskas

Magistro darbas

***Aspergillus* sp. lipazės imobilizacija ir pritaikymas  
organinei sintezei**

Darbo vadovė:

Dr. (HP) Vida Bendikienė

Vilnius, 2016

# ***Aspergillus* sp. lipazės imobilizacija ir pritaikymas organinei sintezei**

Magistro darbas

**Simas Kazlauskas**

Vilniaus Universitetas

Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra

## **Santrauka**

Lipazės - fermentai, kurių fiziologinė funkcija - katalizuoti riebalų, t.y., triacilglicerolių hidrolizę iki diacilglicerolių, monoacilglicerolių, riebalų rūgščių bei glicerolio. Lipazės ypatingos tuo, jog geba katalizuoti ne tik riebaluose esančių esterinių jungčių hidrolizę, bet ir įvairių esterių sintezės bei peresterinimo reakcijas bevandenėje terpėje. Dėl to šie fermentai jau virš dviejų dešimtmečių naudojami įvairiose pramonės šakose. Geriausiu lipazių šaltiniu pramonei tinkamiems kiekiams gauti pripažintos įvairios filamentinių grybų rūšys, tarp kurių ir *Aspergillus* spp., nes jų sintetinės lipazės yra užląstelinės, pasižymi plačiu substratiniu savitumu bei aukštu stabilumu.

Šio darbo pagrindinis tikslas buvo rasti greitą, pigų bei efektyvų fermentų imobilizacijos metodą, kad imobilizuota *Aspergillus* sp. lipazė pasižymėtų didžiausiu aktyvumu organinėje terpėje. Po pasirinktų lipazės imobilizacijos būdų optimizacijos buvo palygintas gautų fermentinių preparatų aktyvumas, termostabilumas bei įvertintos praktinio pritaikymo, t.y., kvapiojo esterio 2-feniletilbutanoato sintezei, galimybės.

*Aspergillus* sp. lipazė buvo imobilizuota trimis būdais: susiuvant fermento agregatus ir gaunant CLEA preparatus (angl. *cross-linked enzyme aggregates*), kovalentiškai imobilizuojant ant magnetito ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanodalelių sankaupų bei adsorbuojant ant cukraus gamybos atliekų pirolizės produkto. Didžiausiu savituoju aktyvumu pentane (14,2 U/mg) pasižymėjo adsorbciniu būdu imobilizuota lipazė. Tai yra daugiau negu 230 kartų didesnis savitasis aktyvumas organinėje terpėje, lyginant su tirpia lipaze (0,06 U/mg). Optimizuotomis kvapiojo esterio 2-feniletilbutanoato fermentinės sintezės reakcijos sąlygomis pasiekta didesnė negu 90 % reakcijos konversija. Ištyrus adsorbciniu būdu imobilizuotos *Aspergillus* sp. lipazės pakartotinio panaudojimo efektyvumą katalizuojant šio esterio sintezės reakciją, nustatyta, jog reakcijos efektyvumas krenta po 20-30 % sulig kiekvienu katalizės ciklu, penkto panaudojimo metu dar pasiekiant 30 % konversiją.

# **Immobilisation and application of *Aspergillus* sp. lipase**

**Simas Kazlauskas**

Vilnius University

Department of Biochemistry and Molecular Biology

## **Summary**

Lipases are enzymes whose natural function is to hydrolyze triglycerides into diglycerides, monoglycerides, fatty acids and glycerol. However, under certain conditions, they are also able to catalyze synthetic reactions such as esterification and transesterification in non-aqueous media. As a result, lipases have been used in various industrial processes for over two decades. Various filamentous fungi, including *Aspergillus* spp., are recognized as the best lipase producers since their produced lipases are extracellular, with wide range of substrate specificity and high stability.

The main goal of this study was to find a fast, inexpensive and efficient immobilisation method for *Aspergillus* sp. lipase that the acquired enzymatic preparation had the highest specific activity in organic media. The selected immobilisation methods were optimised and the acquired enzymatic preparations were compared according to their specific activity in organic media, thermostability, efficiency for natural fragrance ester 2-phenylethylbutanoate enzymatic synthesis and reusability.

*Aspergillus* sp. lipase was immobilised by three different methods: acquiring CLEA by cross-linking enzyme aggregates, covalently immobilising on magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticle clusters and adsorbing on a support which was acquired by pyrolysing sugar industry waste. Of all the acquired and optimised enzymatic preparations, adsorbed lipase showed highest specific activity in pentane (14.2 U/mg) which is over 230 times higher than that of the soluble *Aspergillus* sp. lipase preparation (0.06 U/mg). Moreover, this enzymatic preparation proved to be an effective catalyst for natural flavour compound 2-phenylethylbutanoate synthesis. Reaction conversion of over 90 % was achieved under optimised conditions. Reusability of adsorbed *Aspergillus* sp. lipase preparation for the 2-phenylethylbutanoate enzymatic synthesis was investigated, resulting in a steady decrease of 20-30 % in enzymatic efficiency by each cycle.