

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DOVILĖ ŠINKŪNIENĖ

LIPAZIŲ ATRANKA IR TAIKYMAS RIEBALŲ RŪGŠČIŲ  
ESTERIŲ SINTEZEI

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2014 metai

Disertacija rengta 2008 – 2013 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje ir Lundo universiteto Biotechnologijos katedroje (Švedija) (2013 m. sausis – balandis).

**Mokslinė vadovė:**

dr. Vida Bendikienė

(Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

## TURINYS

Santrumpų sąrašas.....	5
ĮVADAS .....	6
1 Literatūros apžvalga.....	9
1.1 Lipazių struktūra, veikimo mechanizmas, savybės.....	9
1.2 Lipazių šaltiniai, kai kurių tirtų lipazių apibūdinimas .....	15
1.3 Lipazių aptikimo ir aktyvumo nustatymo metodai .....	24
1.4 Tirpiklio pasirinkimas lipazių katalizuojamoms reakcijoms .....	32
1.5 Vandens įtaka lipazių katalizuojamoms reakcijoms .....	35
1.6 Acilglicerolių acilgrupės migracija.....	39
1.7 Lipazių panaudojimas pramonėje ir biokatalizei .....	43
1.8 Biodyzelino sintezė .....	53
1.9 Kvapiųjų esterių fermentinė sintezė.....	65
1.10 Lipazių imobilizacija.....	68
2 MEDŽIAGOS IR METODAI.....	78
2.1 Medžiagos .....	78
2.2 Lipazių imobilizavimas.....	79
2.3 Baltymų kiekio nustatymas .....	80
2.4 Lipazės aktyvumo nustatymas .....	81
2.5 Trioleino hidrolizė ir peresterinimas metanoliu heksane.....	81
2.6 Fermentinė biodyzelino sintezė be tirpiklio.....	82
2.7 Etanolizė – reakcijos priedų įtaka .....	82
2.8 Monoacilglicerolių sintezė .....	83
2.9 Fenetilo esterių sintezė.....	84
2.10 Plonasluoksnė chromatografija ir densitometrija.....	84
2.11 Dujų chromatografijos analizė .....	86
2.12 Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos analizė.....	90
2.13 Atsako paviršiaus metodologija .....	90
3 Rezultatai ir jų aptarimas .....	94
3.1 <i>Enterobacter aerogenes</i> lipazės imobilizacija ir savybės .....	94
3.1.1 Adsorbicija ant lignino, chitino, chitozano bei jų magnetinių darinių .....	95
3.1.2 Kovalentinė imobilizacija ant magnetinio lignino, chitino ir chitozano bei polimerinių darinių.....	97
3.1.3 Natyvių ir imobilizuotų <i>Enterobacter aerogenes</i> lipazės preparatų savybės.....	100
3.1.4 <i>Enterobacter aerogenes</i> lipazės galimybės katalizuoti peresterinimą.....	103
3.2 Trioleino hidrolizės ir peresterinimo reakcijų tyrimas, naudojant atsako paviršiaus metodologiją .....	106
3.2.1 Trioleino hidrolizė.....	106

3.2.2	Trioleino peresterinimas metanolium.....	119
3.3	Biodyzelino sintezė iš linų sėmenų aliejaus ir kiaulių taukų mišinio	122
3.3.1	Fermentų atranka.....	123
3.3.2	Atsako paviršiaus metodologijos taikymas.....	124
3.4	Lipazių specifiškumo ir acilgrupės migracijos įtaka biodyzelino sintezei.....	135
3.4.1	Lipazių imobilizacija.....	137
3.4.2	Etiloleato susidarymas: reakcijos priedų įtaka skirtingų fermentų katalizuojamoms reakcijoms.....	138
3.4.3	Silikagelio įtaka reakcijos eigai.....	149
3.4.4	Vandens įtaka reakcijos eigai.....	150
3.4.5	Šalutinis reakcijos produktas – oleino rūgštis.....	153
3.4.6	Reakcijos produktų sudėtis priklausomai nuo trukmės. Skirtingų acilglicerolių pradiniai etanolizės greičiai.....	154
3.4.7	Fermentų naudojimas etapais.....	158
3.5	Feniloktanoato ir kitų fenilo esterių fermentinė sintezė.....	163
3.5.1	Fermentų atranka feniloktanoato sintezei.....	163
3.5.2	Tirpiklio įtaka.....	167
3.5.3	Modelio sudarymas ir optimalių reakcijos sąlygų nustatymas naudojant atsako paviršiaus metodologiją.....	170
3.5.4	Kokosų aliejaus peresterinimas feniletanolium.....	176
3.5.5	Įvairaus grandinės ilgio riebalų rūgščių esterinimas feniletanolium.....	177
	Išvados.....	181
	Publikacijos disertacijos tema.....	182
	Padėka.....	184
	Literatūra.....	185
	Priedai.....	202

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ANL – <i>Aspergillus niger</i> lipazė	PFL – <i>Pseudomonas fluorescens</i>
BMBK – Vilniaus universiteto	lipazė
Biochemijos ir molekulinės biologijos	RA – rapsų aliejus
katedra	RAL – <i>Rhizopus arrhizus</i> lipazė
CALB – <i>Candida antarctica</i> lipazė B	RML – <i>Rhizomucor miehei</i> lipazė
CRL – <i>Candida rugosa</i> lipazė	RNL – <i>Rhizopus niveus</i> lipazė
DAG – diacilglicerolis (digliceridas)	RR – riebalų rūgštis (-ys)
DO – dioleilglicerolis (dioleinas)	TAG – triacilglicerolis (trigliceridas)
KT – kiaulių taukai	TK – trikaprilinas
LSA – linų sėmenų aliejus	(gliceriltrioktanoatas)
MAG – monoacilglicerolis	TLL – <i>Thermomyces lanuginosus</i>
(monogliceridas)	lipazė
MeO – metiloleatas	TO – trioleilglicerolis (trioleinas)
MO – monooleilglicerolis	
(monooleinas)	

### Lygiagrečiai vartojami terminai

1(3)-monooleinas – 1-monooleinas	Amberlite IR 120 (Na) –
1,2(2,3)-dioleinas – 1,2-dioleinas	neutralizuotas Amberlite
Acilgrupės migracija – acilmigracija	Inhibicija – slopinimas
Alkoholizė – peresterinimas	Katalizavimas – skatinimas
Amberlite IR 120 (H) – rūgštinis	Silikagelis 60 – silikagelis
Amberlite	Triacilglicerolis - trigliceridas

Tarptautiniai terminai naudojami remiantis Chemijos terminų žodynu ir Valstybinės lietuvių kalbos komisijos skelbiamu Lietuvos Respublikos terminų banku.

## IVADAS

Kaip pasiekti gerą reakcijos išeią? - tai tyrėjams ir gamintojams nuolat išskylantis klausimas, nepriklausomai nuo to, kokius naujus junginius jie siekia susintetinti ar kokį naują sintezės būdą panaudoti. Biotechnologai ne vieni ieško atsakymų į šį klausimą, tačiau reakcijas katalizuojant fermentiniais katalizatoriais – gyvų organizmų produktais – atrodo, kad atsakymus rasti sunkiau, nes fermentai tarsi turi savo „charakterį“ ir kartais ne be pagrindo pavadinami „kaprizingais“ ir „nenuspėjamaais“. Iš tiesų, tik „asmeniškai susipažinus“ su fermentiniu katalizatoriumi – ištyrus kiekvieno atskiro preparato savybes ir tikslinės reakcijos sąlygų įtaką fermento aktyvumui bei reakcijos eigai – galime tikėtis greitos reakcijos ir geros išeių.

Lipazės (EC 3.1.1.3) – tai fermentai, natūraliai katalizuojantys riebalų (triacilglicerolių) hidrolizę. Biotechnologijoje jie yra plačiausiai naudojama fermentų grupė ne prigimtinėi – hidrolizės – bet sintezės reakcijai katalizuoti. Šios reakcijos tiksliniai produktai yra esteriai. Vieni aktualiausių šiandienos produktų yra riebalų rūgščių trumpų alkoholių esteriai (biodyzelinas). Biodyzelino sintezės tyrimams skiriama daug jėgų, norint fermentinį procesą pritaikyti pramonėje ir taip sumažinti nuolat brangstančių neatsinaujinančių naftos išteklių vartojimą ir neigiamą įtaką aplinkai. Ne mažiau svarbūs lipazėmis katalizuojamų reakcijų produktai yra ypatingų savybių turintys esteriai (kvapieji esteriai, vaistų pirmtakai, sudėtingos struktūros regio- ir enantio- izomerai – pirmtakai sudėtingos struktūros junginių sintezei), be to, lipazės naudojamos raceminių junginių atskyrimui. Lipazės patrauklios ir populiaros dėl to, kad jas galima naudoti ypatingai švelniomis sąlygomis, ir, kas svarbiausia, esant įvairių organinių tirpiklių, hidrolizės, interesterifikacijos (alkoholizės, acidolizės), esterifikacijos, aminolizės reakcijoms, naudojant chemiškai nestabilius substratus (pavyzdžiui, turinčius nesočiųjų jungčių) bei gaunant grynus produktus.

Sėkminga katalizės eiga priklauso nuo daugelio veiksnių – substratų bei tinkamo fermento pasirinkimo, fermento preparato formos, reakcijos sąlygų ir

t.t., todėl disertacinio darbo metu buvo tirta tiek fermento preparato paruošimo (imobilizavimo), tiek fermento bei substratų pasirinkimo bei reakcijos sąlygų įtaką pramonei svarbių reakcijų eigai ir išėjimui, būtent: riebalų hidrolizei, biodyzelino sintezei, kvapiųjų esterių sintezei.

Šio **darbo tikslas** buvo ištirti ir optimizuoti riebalų rūgščių esterių sintezės, panaudojant lipazes, būdus.

Šiam tikslui įgyvendinti buvo išskirti pagrindiniai **uždaviniai**:

1. Ištirti imobilizacijos įtaką Lietuvoje paruoštos *Enterobacter aerogenes* lipazės katalizinėms savybėms.
2. Ištirti komercinių lipazių hidrolizines ir riebalų rūgščių esterių sintezės savybes naudojant modelinius, natūralius ir sudėtinius substratus ir optimizuoti reakcijos sąlygas.
3. Ištirti priedų panaudojimo acilgrupės migracijos katalizei galimybes ir jų įtaką trioleino etanolizės (biodyzelino sintezės) reakcijoms.
4. Ištirti lipazių substratinio specifiškumo skirtingoms acilglicerolių klasėms bei regioizomerams įtaką trioleino etanolizės reakcijai.
5. Biodyzelino sintezės katalizei panaudoti lipazes, remiantis žiniomis apie jų specifiškumą acilgliceroliams, priedų įtaką acilgrupės migracijai ir tarpinių reakcijos produktų konversiją.
6. Atrinkti fermentus ir optimizuoti fenetiloktanoato sintezę.

## Mokslinis naujumas

Darbe tirta *Enterobacter aerogenes* lipazė yra neseniai išskirta Lietuvoje (UAB „Biocentras“). Darbo metu pirmą kartą atlikti jos imobilizavimo tyrimai, nustatytos tirpos ir imobilizuotos lipazės veikimui optimalios sąlygos, ji išmėginta sintezės reakcijoms katalizuoti.

Linų sėmenų aliejaus ir kiaulių taukų mišinys – neseniai pradėtas tirti sudėtinis substratas biodyzelino sintezės reakcijoms. Jo transesterinimo atrankai ir optimizavimui naudoti fermentai tirti pirmą kartą. Trioleino hidrolizės ir transesterinimo heksane tyrimai, naudojant atsako paviršiaus metodologiją (RSM), taip pat yra unikalūs, ypač rečiau literatūroje sutinkamų fermentų (Lipopan F BG, Lipopan 50 BG, Lecitase) atžvilgiu.

Biodyzelino sintezė fermentiniu būdu yra intensyviai tiriama sritis, tačiau gilinimasis į tarpinių reakcijos produktų virsmus, regioizomerų sudėtį ir fermentų taikymas, naudojantis šiomis žiniomis, yra nauja koncepcija. Nors ir pripažįstama, kad acilgrupės migracija vyksta, dėl kurios naudojant 1,3-specifinius fermentus peresterinimo laipsnis dažnai didesnis, nei 66 %, tikslingai acilgrupės migracija katalizuojama retai, todėl disertacinio darbo metu atlikti tyrimai buvo žingsnis į priekį šioje sudėtingų tyrimų srityje.

Pirmą kartą optimizuota fenetiloktanoato sintezė ir jis susintetintas didelėmis išeigomis, panaudojus imobilizuotą fermentą Lipozyme RM IM.

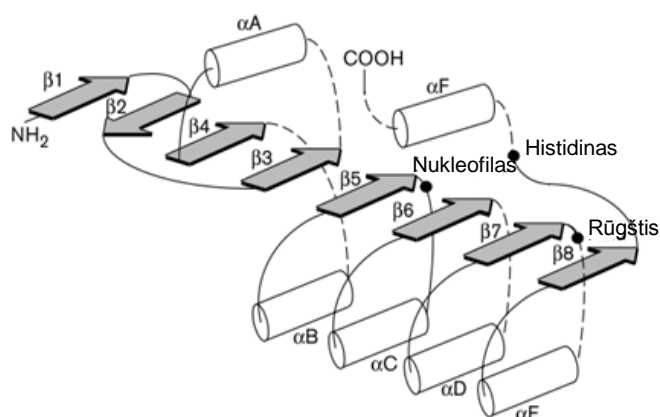


# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Lipazių struktūra, veikimo mechanizmas, savybės

### 1.1.1 Struktūra

Lipazės yra  $\alpha/\beta$ -hidrolazių šeimos nariai, jos turi iš  $\beta$ -klostių sudarytą šerdį, kurią supa  $\alpha$  spiralės (1.1, 1.3, 1.4 pav.). Lipazių aktyvusis centras chemiškai panašus į proteazių: jį sudaro serino, histidino ir asparto/glutamo aminorūgščių katalitinė triada [1–4], tačiau nuo proteazių jis skiriasi savo struktūra: serino hidroksilgrupė orientuota kitaip, nei proteazių serinas, todėl lipazių katalitinė triada pasižymi invertuota stereochemija [5]. Aktyviojo centro nukleofilinė serino grupė yra plaukų segtuko formos linkyje tarp  $\beta$  klostės ir  $\alpha$  spiralės, labai konservatyvioje pentapeptidinėje sekoje Gly-X-Ser-X-Gly, formuojančioje būdingą  $\beta$ -linkio- $\alpha$  motyvą, vadinamą „nukleofiline alkūne“ [2, 3]. Dėl staigaus posūkio geometrijos ji yra lengvai pasiekiamas substrato bei hidrofiliškos vandens molekulės [4]. Nukleofilinės alkūnės buvimas lemia oksianijonino plyšio – substratų prisijungimo vietos – susiformavimą, jis reikalingas neigiamai įkrautos pereinamosios būsenos stabilizavimui. Oksianijoninį plyšį dažniausiai sudaro du karkaso aminorūgščių azoto atomai: pirmas – aminorūgštis, einančios iš karto po nukleofilo, antrasis dažniausiai lokalizuotas tarp  $\beta 3$  klostės ir  $\alpha A$  spiralės [4].



1.1 pav. Antrinė „kanoninės“  $\alpha/\beta$  hidrolazių šeimos struktūra.  $\alpha$  spiralės ir  $\beta$  klostės pavaizduotos atitinkamai kaip balti cilindrai ir pilkos rodyklės. Katalitinės triados vieta pavaizduota juodais taškais. Punktyrinės linijos rodo galimų sekos intarpų vietas [2].

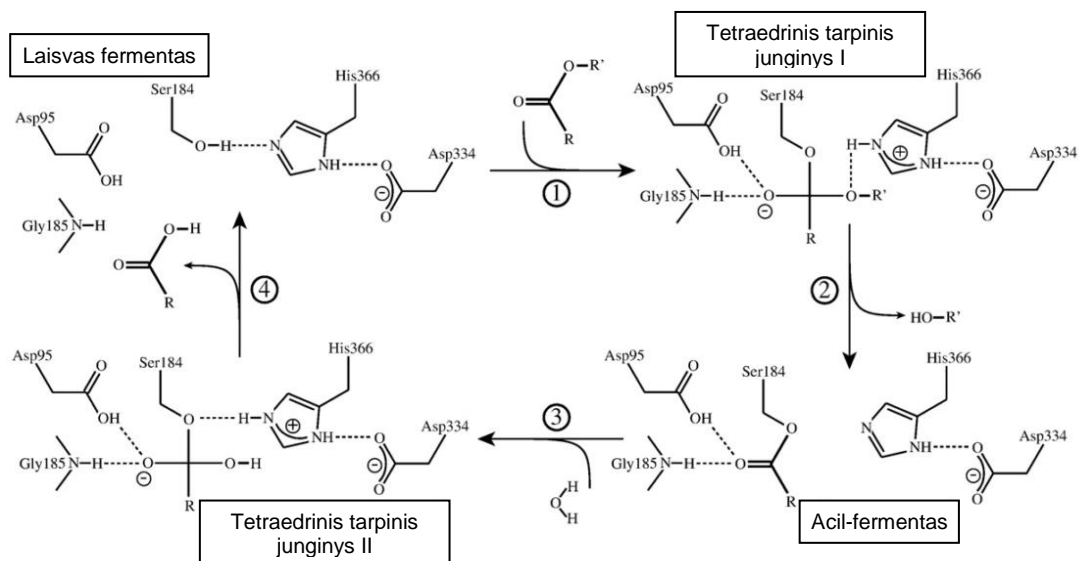
$\alpha/\beta$  Hidrolazių aktyvųjų centrą sudaro katalitinė triada: nukleofilas, rūgštis ir histidinas, lipazių atveju tai aminorūgštys Ser – Asp (Glu) – His [4, 6]. Aktyvųjų lipazių centrą dengia dangtelis ar skydelis, sudarytas iš amfifilinės spiralinės peptidinės sekos [6]. Kai kurios lipazės turi dvigubą dangtelį [7]. Tačiau yra ir išimčių, pavyzdžiui, *Candida antarctica* lipazė B turi labai mažą ir paprastą stogelį, kuris net ir uždaroje formoje ne visiškai izoliuoja aktyvų centrą, be to, ji neturi aukščiau minėtos konservatyvios pentapeptidinės sekos apie aktyvaus centro seriną [8].

Pleiss [9], priklausomai nuo aktyvaus centro geometrijos, suskirstė lipazes į tris pogrupius: 1) lipazės su hidrofobiniu, plyšio formos aktyviu centru, esančiu netoli baltymo paviršiaus (*Rhizomucor* ir *Rhizopus* lipazės); 2) piltuvėlio formos aktyvų centrą turinčios lipazės (*C. antarctica*, *Pseudomonas*, žinduolių kasos lipazės); 3) tunelio formos aktyvų centrą turinčios lipazės (*Candida rugosa*).

Pirmoji išspręsta kristalinė struktūra 3,1 Å raiška buvo *Rhizomucor miehei* lipazės [10].

### 1.1.2 Veikimo mechanizmas

Lipazių katalizėje pagrindinį vaidmenį vaidina aktyvaus centro katalitinė triada, kuri nukleofiliškai prisijungia ir orientuoja substratus, susidarant dviems tetraedriniams tarpiniams junginiams. Šis veikimo mechanizmas panašus į serino proteazių tiek aktyvaus centro struktūra, tiek tetraedrinių tarpinių junginių sudarymo principu. Aktyvaus centro katalitinę triadą sudaro Ser – Asp (Glu) – His aminorūgštys [6]. Katalizės metu esterinio ryšio karboksilinės grupės anglies atomą nukleofiliškai atakuoja aktyvaus centro Ser hidroksilgrupė. Susidaro pirmasis tetraedrinis tarpinis junginys, tuomet atpalaiduojama alkoholio molekulė ir susidaro acil-fermento tarpinis junginys. Vandens molekulei atakuojant kompleksą (nukleofilinė ataka), vėl susidaro tetraedrinis tarpinis junginys, kuris atpalaiduoja rūgšties molekulę ir virsta natyviu fermentu (1.2 pav) [11, 12].



1.2 pav. Siūlomas *Candida antarctica* lipazės A reakcijos mechanizmas. Pirmame etape substratas (esteris) patenka į aktyvųjį centrą ir nukleofiliškai atakuojamas Ser184, kuris, savo ruožtu yra aktyvuotas, nes jo protonas, patrauktas link His366/Asp334 poros. Susidaręs tetraedrinis tarpinis junginys stabilizuojamas Gly185 azoto ir protonizuoto Asp95. Suyrant tarpiniam junginiui, His 366 atiduoda savo protoną alkoholiui, kuris palieka aktyvų centrą, o į jį ateina vandens molekulė. Po to, kai ji aktyvuojama histidino/asparto poros, vandens molekulė atakuoja acilfermento tarpinį junginį, susidarant antrajam tetraediniam tarpiniam junginiui, kuris suirdamas atpalaiduoja karboksirūgštį [13].

Katalizės metu vykstantys aktyvaus centro erdviniai persitvarkymai susiję su fermento struktūros pokyčiais, vykstant aktyvavimui sąlyčio paviršiumi, dangtelio atsidarymo metu (1.1.3.1 skyrius).

### 1.1.3 Savybės

#### 1.1.3.1 Aktyvavimas sąlyčio paviršiumi

Dauguma lipazių pasižymi įdomia savybe: jų aktyvumas yra sąlyginai mažas kuomet tirpale ištirpę substrato monomerai, tačiau monomerams agregavus į supersubstratą (emulsiją ar micelių tirpalą) aktyvumas drastiškai padidėja. Šis reiškinys vadinamas aktyvavimu sąlyčio paviršiumi [1]. Lipazių fiziologinė funkcija yra katalizuoti reakcijas heterogeninėje aplinkoje, todėl lipazės evoliucionavo į neįprastai stabilias struktūras tam, kad sąlyčio paviršius jų nedematūruotų. Dėl tokios struktūros lipazės turi taikomosios katalizės požiūriu labai svarbią savybę – jos stabilios net organiniuose tirpikliuose [6].

Tačiau Ali ir kiti teigia, kad ne visos lipazės pasižymi aktyvavimu sąlyčio paviršiumi ir tai nėra tinkamas kriterijus lipazėms klasifikuoti (atskirti nuo esterazių) [14].

Lipazių aktyvumas sąlyčio paviršiuje yra kompleksinis reiškinys. Paviršius yra heterogeninė sistema, vandeninėje ir supersubstrato paviršiaus fazėse lipazės molekulės, substratai ir produktai pasiskirsto netolygiai, be to, šių komponentų pasiskirstymas dinamiškai kinta vykstant hidrolizei (išsiskiria vandenyje netirpūs produktai, kurie keičia molekulinę organizaciją, komponentų pasiskirstymą sąlyčio paviršiuje ir jo savybes) [15]. Sąlyčio paviršiaus enzimologija palapsniui pripažįstama kaip atskira tyrimų sritis, tačiau dauguma vadovėlių vis dar neaptaria šio aspekto [16].

Lipazių aktyvų centrą dengiančio dangtelio būseną priklauso nuo aplinkos dielektrinės konstantos. Fermentui priartėjus prie hidrofobinės aplinkos, dangtelis juda tarsi sukdamasis ant vyrių ir atidengia aktyvų centrą. *Rhizomucor miehei* lipazės atveju dangtelį sudaro aminorūgštys nr. 83-94. Dangtelio atsidarymas ir fermento aktyvavimas kontroliuojamas turinčių krūvį Arg86 ir Asp91 aminorūgščių. Neaktyvioje konformacijoje Asp91 yra veikiamas stumiančių jėgų ir stumia dangtelį į atvirą konformaciją, be to, aplinkoje, kurios dielektrinė konstanta maža, Arg86 priartėja prie Asp61 ir sudaro druskų tiltelį, stabilizuojantį aktyvią konformaciją su atidarytu dangteliu [17]. Dangtelis ne tik funkcionuoja kaip vartai, kuriuos atidarius substratas gali patekti į aktyvų centrą, tačiau jam atidarius padidėja fermento paviršiaus, esančio aplink aktyvų centrą, hidrofobiškumas, taip palengvinamas hidrofobinio substrato prisijungimas [18].

### **1.1.3.2 Lipazių specifiskumas (savitumas)**

Lipazės pasižymi poziciniu (regio-), substratiniu (lemia riebalų rūgščių ir alkoholio prigimtis) ir stereospecifiškumu.

Pagal regiospecifiškumą lipazės gali būti skiriamos į: 1) nespecifines (katalizuojamos reakcijos prie visų triacilglicerolio hidroksilgrupių; 2) 1,3-specifines (teikia pirmenybę triacilglicerolio *sn*-1 ir *sn*-3 pozicijoms); 3) 2-specifines lipazes (teikia pirmenybę triacilglicerolio *sn*-2 pozicijai, tokių nedaug).

Lipazės pasižymi plačiu substratiniu specifiškumu. Jos gali hidrolizuoti įvairaus grandinės ilgio riebalų rūgščių (RR) ir alkoholių esterius, o mažai vandens turinčioje aplinkoje jos gali vykdyti esterinimo, peresterinimo ir interesterinimo reakcijas [1].

Dauguma lipazių gamtoje yra indukuojamos, tik kelios lipazės – konstitutyvios. Dažniausiai lipazės yra ląstelių sekretuojamos į aplinką [15].

### **1.1.3.3 Lipazių neišrankumas**

Hult ir Berglund fermentų neišrankumą (*enzyme promiscuity*) apibrėžė kaip fermento galimybę katalizuoti skirtingas nuo savo fiziologinės funkcijos reakcijas ir suskirstė į tris pagrindines klases:

- a) neišrankumą sąlygoms – galimybę katalizuoti reakcijas nenatūraliomis sąlygomis (bevandenė aplinka, ekstremalios temperatūros ar pH);
- b) neišrankumą substratams – fermentai gali naudoti skirtingus substratus vienai panašiai cheminei reakcijai atlikti;
- c) katalitinį neišrankumą – galimybę katalizuoti chemiškai skirtingas transformacijas [19].

Kazlauskas katalitinį neišrankumą (angl. *catalytic promiscuity*) apibrėžė kaip vieno aktyvaus centro galimybę katalizuoti daugiau nei vieną cheminę transformaciją. Šios transformacijos skiriasi dalyvaujančia funkicine grupe, (t.y. skirtingu susidarančio ar suardomo ryšio tipu), ir/arba katalitiniu mechanizmu ar ryšio sudarymo/išardymo keliu. Dažniausiai katalitinė įvairovė pasižymi abiejomis savybėmis [20].

Katalitinis neišrankumas gali būti atsitiktinis (reakcijos katalizuojamos laukinio tipo fermento) arba indukuotas (naujas mutacijų sukeltas fermento aktyvumas) [1].

Lipazių katalitinio neišrankumo pavyzdžiai galėtų būti amidinio ryšio sudarymo reakcijos (aminai – alternatyvūs nukleofilai), taip pat aldolinio pridėjimo, racemizacijos ir epoksidacijos reakcijos [21], vis labiau domimasi lipazių katalizuojamomis C-C ryšio susidarymo reakcijomis [1].

#### **1.1.3.4 Lipazių stabilumas**

Lipazės pasižymi unikaliu stabilumu. Praktiniu požiūriu lipazių stabilumo savybės galima suskirstyti į atsparumą rūgštims, šarmams, tirpikliams, aukštai ar žemai temperatūrai.

Duomenų apie rūgštims atsparias lipazes nėra daug. Parodyta, kad *A. niger* NCIM 1207 optimalus pH yra 2,5 (aktyvi iki pH 1,5). Šarmams atsparių lipazių nemažai, šios lipazės dažnai būna ir termostabilios. Šarmams atsparių lipazių pavyzdžių randama tiek bakterinių (tam tikrų *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* ir kt. genčių) tiek grybinių (*Penicillium*, *Fusarium*) lipazių tarpe [15]. Termostabilios lipazės yra gana dažnos. Keletas *Bacillus* lipazių pasižymi aktyvumu virš 60 °C, *Bacillus thermoleovorans* ir *R. oryzae* gali gerai veikti 70–75 °C, o *Archaea pyrococcus horikoshii* stabili 95 °C [15]. Lipazės, gerai veikiančios žemose temperatūrose, kuriose mezofiliniai fermentai mažai aktyvūs ar neaktyvūs, pasižymi tam tikrais specifiniais struktūros požymiais, pavyzdžiui, dideliu struktūros lankstumu aplink aktyvų centrą, kuris leidžia lengvai įtalpinti į jį substratą, taip pat žemu giminingumu substratui [22]. Organiniuose tirpikliuose lipazės dažniausiai yra stabilesnės nei kiti fermentai, nes jos iš prigimties skirtos veikti hidrofobinio substrato ir vandeninės fazės sąlyčio paviršiuje. Tačiau kai kurios lipazės organiniuose tirpikliuose pasižymi netgi didesniu termostabilumu, nei vandenyje, be to, tirpikliuose jos gali vykdyti reakcijas, kurios vandeninėje terpėje slopinamos [23].

Neseniai sukurtoje lipazių duomenų bazėje LIPABASE galima rasti taksonominę, struktūros ir biocheminę informaciją apie įvairių organizmų lipazes [15].

## 1.2 Lipazių šaltiniai, kai kurių tirtų lipazių apibūdinimas

Nors yra apibūdinta daug lipazių, išskirtų iš įvairių šaltinių, tačiau jų katalizuojamų reakcijų biotechnologiniams bei pramoniniams tyrimams ir taikymui naudojamas ribotas skaičius. Dažniausiai naudojamos šių mikroorganizmų lipazės: *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus* [21].

Lipazes galima suskirstyti pagal jų šaltinį (mikroorganizmą, kuris produkuoja lipazes) į bakterines, mielių ir grybines. Platesnis pagrindinių lipazių producentų sąrašas pateiktas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Pagrindiniai lipazes produkuojantys mikroorganizmai, pagal [15, 24, 25]

Bakterijos	Grybai	
	Mielės	Filamentiniai grybai
<i>Bacillus subtilis, pumilus, licheniformis, coagulans, stearothermophilus, alcalophilus</i>	<i>Candida rugosa, tropicalis, albicans, antarctica, cylindracea, parapsilopsis, deformans, curvata, valida</i>	<i>Rhizopus arrhizus, delemar, japonicus, niveus, oryzae, homothallicus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhodotolura glutinis, pilimornae</i>	<i>Aspergillus niger, terreus</i>
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Penicillium camembertii</i>
<i>Burkholderia multivorans, cepacia</i>	<i>Geotrichum asteroides, candidum</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
	<i>Trichosporon fermentans, asteroides</i>	<i>Mucor pusillus</i>
	<i>Pichia bispora, mexicana, sivicola, xylosa, burtonii</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>

Bakterinės lipazės dažniausiai yra glikoproteinai, rečiau - lipoproteinai [15].

Dauguma filamentinių grybų fermentų savaime yra užląsteliniai, patys grybai yra lengvai kultivuojami ant nebrangaus kieto substrato, todėl grybinės lipazės išgaunamos pigiau. Kita vertus, netgi juos auginant skystoje terpėje, lipazes lengva ir pigu ekstrahuoti, todėl grybinės lipazės yra geresni kandidatai pramoninei lipazių sintezei nei bakterinės [15]. Dėl šių savybių bei dėl termo- ir pH stabilumo, specifiškumo substratams, aktyvumo organiniuose tirpikliuose komerciškai platinamos *A. niger*, *C. cylindracea*, *T. lanuginosus*, *R. miehei*, *R. arrhizus*, *R. delemar*, *R. japonicus*, *R. niveus* ir *R. oryzae* lipazės [26].

Genai, koduojantys įvairias lipazes, buvo klonuoti ir jų raiška padidinta [27]. Iš genetiškai modifikuotų mikroorganizmų Novozymes® gaminamos lipazės pateiktos 1.2 lentelėje.

1.2 lentelė. Novozymes® lipazės, gaminamos genetiškai modifikuotų mikroorganizmų pagalba [28, 29].

Lipazės preparato komercinis pavadinimas	Kamienas	Pramoninė naudojimo sritis
Lipopan	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Kepimo
Lipozyme	<i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Rhizomucor miehei</i>	Naftos ir riebalų
Lecitase Ultra (Fosfolipazė A1)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Naftos ir riebalų
Palatase	<i>Rhizomucor miehei</i>	Pieno
Lipex	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Detergentų
Lipolase	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Detergentų
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i> B	Biokatalizės
Resinase	<i>Candida rugosa</i>	Popieriaus

Šiame skyriuje bus plačiau aprašytos biotechnologiniams tikslams dažniausiai naudojamos bei disertacinio darbo metu tirtos lipazės.



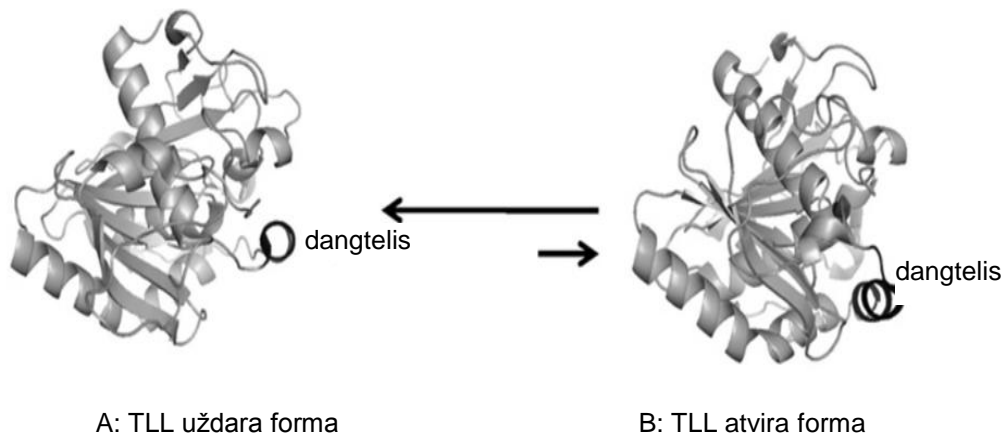
### 1.2.1 *Thermomyces lanuginosus* lipazė

*Thermomyces lanuginosus* (seniau vadinta *Humicola lanuginosa*) grybo produkuojama lipazė (TLL) yra dažnai pasirenkama tyrimams ir taikomosioms reakcijoms dėl savo kainos, didelio aktyvumo, *sn*-1,3-specifiškumo.

1994 m. NovoNordisk® (dabar Novozymes®) pradėjo gaminti pirmąją komercinę lipazę Lipolase®, produkuojamą *Aspergillus oryzae* mikroorganizmo, į kurį perkelta TLL koduojanti seka [30]. TLL yra bazofilinė (optimalus pH apie 9), turi termostabilumo požymių (aktyvi 55 – 60 °C), temperatūrinis optimumas apie 35 °C [31, 32]. Šiuo metu komerciniu būdu platinama tiek tirpi, tiek imobilizuota TLL forma [33]. Novozymes® gaminamas imobilizuotos TLL preparatas vadinasi Lipozyme TL IM ir klasifikuojamas kaip tinkamas naudoti maisto perdirbimui. [34]. Nors ši lipazė buvo skirta maisto pramonei, ji taikoma įvairiose srityse: biodyzelino, ypatingųjų chemikalų sintezei (daugiausiai enantio- ir regioselektyviems procesams), yra detergentų sudedamoji dalis [33, 35]. Maisto pramonėje TLL buvo pradėta naudoti po to, kai Novozymes® sukūrė naują lipazių imobilizavimo ant pigaus neorganinio nešiklio (granuliuoto silikagelio) technologiją, fermentą adsorbuojant ir įterpiančią kapsulę tuo pačiu metu. Hidrofilinė nešiklio prigimtis užtikrina pakankamą vandens sluoksnį aplink fermentą, todėl į reakcijos mišinį jo nereikia pilti papildomai [36, 37]. Lipozyme TL IM nepasižymi selektyvumu RR grandinės ilgiui (tiek laisvos, tiek trigliceridų sudėtyje) ar nesotumo laipsniui interesterinimo reakcijose heksane [38].

Struktūros atžvilgiu TLL yra labai panaši į *Rhizomucor miehei* lipazę (RML) [35]. TLL sudaro viena baltymo grandinė, susidedanti iš 269 aminorūgščių. Molekulinė masė yra 31700 Da, izoelektrinis taškas 4,4 [39]. Jos struktūra išspręsta 3,25 Å ir 1,8 Å tikslumu. Baltymas - sferinis, 35 Å X 45 Å X 50 Å formos, su aštuoniomis centrinėmis paralelinėmis β-klostėmis, kurias jungia penkios α-spiralės. Dangtelis, dengiantis aktyvų centrą, sudarytas

iš judrios  $\alpha$ -spiralės (86-93 aminorūgštys). Tretinė atviros ir uždaros TLL struktūra pavaizduota 1.3 pav. [33].



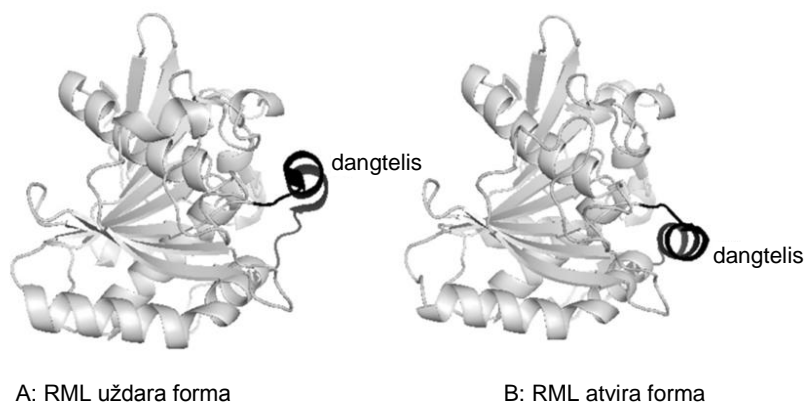
1.3 pav. *Thermomyces lanuginosus* lipazės uždara (A) ir atvira (B) konformacija [33].

Lipazės yra linkę sudaryti bimolekulinius agregatus, aktyviems centrams atsisukant vienas prieš kitą. TLL atveju ši savybė netgi stipriau išreikšta, nei kitų lipazių, todėl vertinant TLL savybes reikia to nepamiršti, nes monomeras ir dimeras pasižymi skirtingu aktyvumu, stabilumu ir selektyvumu [40].

### 1.2.2 *Rhizomucor miehei* lipazė

*Rhizomucor miehei* lipazė (RML) pirmą kartą aprašyta 1973 m. Aptikus, kad *Rhizomucor miehei* grybas gamina esterazę, gebančią skaidyti įvairius riebalus (aliejus, taukus) ir keletą sintetinių substratų (pvz. įvairių RR ir sorbitolio esterius), RML pradėta naudoti maisto modifikavimui [41].

Tai pirmoji lipazė, kurios struktūra išspręsta 1,9Å skiriamąja geba [10], ji buvo detaliai tirta, paviršiaus aktyvavimo mechanizmas gerai žinomas [9, 17, 42]. RML tretinė struktūra pavaizduota 1.4 pav.



1.4 pav. *Rhizomucor miehei* lipazės uždara (A) ir atvira (B) konformacija [43].

Fermentas priskiriamas 1,3-specifinėms lipazėms, jo molekulinė masė yra 31600 Da, izoelektrinis taškas – 3,8 [44].

Šiuo metu RML naudojama įvairiems cheminiams procesams katalizuoti: karboksiesterių, biodyzelino, terpenų sintezei, raceminių mišinių atskyrimui, polimerų modifikavimui bei biosensoriams. Regioselektyviai atliekamos hidrolizės, esterinimo, acidolizės, peresterinimo reakcijos ir cukrų modifikacijos, taip pat retesnės reakcijos (laktonizacijos, amidinių ryšių susidarymo, tiolinių grupių esterinimo ir peresterinimo) [43].

Novozymes® platina komercinius RML preparatus: skystą Palatase 20000 L, ir imobilizuotą – Lipozyme RM IM. Imobilizuoto fermento nešiklis – silpna anijoninė mainų derva, sudaryta fenolio-formaldehido kopolimerų pagrindu Duolite ES 562 [34]. Įvairiuose RML imobilizacijos tyrimuose pastebėta, kad nešiklis pakeičia lipazės specifiškumą riebalų rūgšties grandinės ilgiui [45, 46].

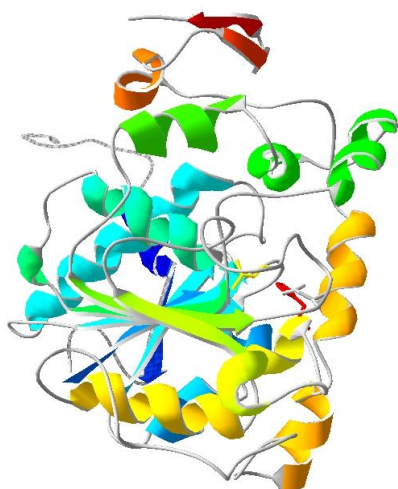
Lyginant aliejaus alkoholizės reakcijas, katalizuojamas TLL, *Pseudomonas* lipazių ir RML, naudojant RML gaunamos mažesnės išėigos, tačiau RML stabilesnė metanolio atžvilgiu ir išlieka aktyvi daugiau nei 120 val., tuo tarpu betirpiklėje aplinkoje TLL greitai inaktyvuojama metanolio [47]. Tačiau turint omenyje, kad fermentų trūkumai gali būti nulemti imobilizacijos proceso, įmanoma, kad patobulinius RML preparatus gali padidėti reakcijų išėigos [43, 48].

### 1.2.3 *Candida antarctica* lipazė B

Iš visų organinėje sintezėje naudojamų fermentų *Candida antarctica* lipazė B (CALB) yra bene naudingiausia ir plačiausiai taikoma įvairioms reakcijoms katalizuoti. Norint dar labiau pagerinti šio fermento savybes genų inžinerijos būdais kuriamos naujos termostabilesnės, aktyvesnės, enantioselektyvesnės ir tirpesnės jo atmainos [49].

Mielės *C. antarctica* pirmą kartą buvo aptiktos Vandos ežere Antarktidoje, bei XIX a. devintajame dešimtmetyje Japonijoje. Šios mielės produkuoja dvi lipazes: A ir B [50]. Dėl išskirtinių jų savybių lipazėmis buvo labai susidomėta ir atsiradus poreikiui gauti didesnius fermentų kiekius, nei produkuoja originalūs *C. antarctica* mikroorganizmai, abu izofermentai buvo klonuoti į *Aspergillus oryzae* mikroorganizmą ir padidinta jų raiška [51].

CALB yra globulinis baltymas, kurio matmenys 30 Å X 40 Å X 50Å, molekulinė masė 33,273 kDa. CALB sudaro 317 aminorūgščių. CALB nuo tipinių lipazių skiriasi tuo, kad beveik neturi stogelio, aktyvus centras (10 Å X 4 Å pločio 12 Å gylio) tačiau priėjimas prie jo sąlyginai apribotas kitomis struktūromis. Tai gali lemti didelį substratinį ir stereospecifiškumą. [8]. Baltymo šerdis yra konservatyvi, ją sudaro aštuonios paralelinės šiek tiek persuktos β-klostės, abiejose pusėse sujungtos α-spiralėmis [8].



1.5 pav. *Candida antarctica* lipazės B struktūra atviroje konformacijoje. Paveikslėlis suformuotas naudojant PDB duomenų bazės 1TCA struktūrą.

CALB yra efektyvi ir selektyvi lipazė, todėl ji naudojama daugelyje taikomųjų reakcijų, pakeičiančių pramoninius sintetinius procesus, tokius kaip kinetinis enantiomerų atskyrimas, aminolizė, esterinimas, tranesterinimas, hidrolizė vandenyje, enantio ir regio-selektyvios reakcijos, įvairių mažamolekulinių ir polimerinių junginių sintezė ir transformacijos, glikolipidų sintezė, flavonoidų sintezė [52, 53]. Palyginus su kitomis lipazėmis, CALB nėra tokia efektyvi hidrolizuojant trigliceridus, tačiau tikriausiai dėl apribotos erdvės hidrofobinėje kišenėje ji labai stereospecifinė esterių hidrolizės ir sintezės reakcijose [54, 55]. Kai kurie autoriai teigia, kad CALB yra 1,3-regiospecifinė trigliceridų atžvilgiu [6], kiti – kad ši lipazė nespecifinė [56], dar kiti - kad specifiškumas priklauso nuo reakcijos sąlygų [57].

Komerciniu būdu platinama tirpi CALB ir imobilizuota jos forma Novozym 435. Nešiklis - makroporinis polimeras (divinilbenzenu skersai sujungtas metakrilo esteris Lewatit VP OC 1600) [21, 58]. Pasak Chen, imobilizuotame preparate fermento kiekis yra tarp 8,5 ir 20 % (m/m), lipazė pasiskirsčiusi 50–100 μm išorinėje nešiklio dalyje [59]. Imobilizuotos formos išskirtinės savybės lemia plačias preparato panaudojimo galimybes farmacijos, maisto pramonėje, organinėje sintezėje, popieriaus ir skalbimo pramonėje, tačiau dažniausiai jis naudojamas chiralinių junginių atskyrimo reakcijoms ir kitiems didelę kainą turintiems ypatingiems cheminiams junginiams gaminti, kuomet katalizatoriaus kaina yra mažiau svarbi, nei jo veiklumas bei grynumas [52]. Kaip bebūtų, Zhao ir Song teigia, kad Novozym 435 nėra idealus preparatas, iš jo atsiplauna pats fermentas bei įvairūs junginiai, kurie gali būti reakcijos substratais [52, 60], be to, šiame preparate yra ir *Candida antarctica* lipazės A [21].

#### **1.2.4 *Rhizopus* lipazės**

Disertacinio darbo metu buvo tirtos dvi *Rhizopus* genties lipazės: *Rhizopus arrhizus* lipazė (RAL) ir *Rhizopus niveus* lipazė (RNL). *Rhizopus arrhizus* pavadinimas gali sukelti šiek tiek sumaištis, *Rhizopus arrhizus* (Fisher) mikroorganizmas savo genetinė medžiaga yra daugiau nei 95 %

panašus į *Rhizopus oryzae*, seniau kai kurie *R. oryzae* kamienai buvo priskirti *R. arrhizus* rūšiai [61]. Naujesni šaltiniai *arrhizus* laiko *oryzae* sinonimu, (dažniau vartojamas *oryzae*) [62]. Šiame darbe aprašant tirtą lipazę naudojamas *arrhizus* terminas dėl tokio gamintojo (Sigma) suteikto tirtu preparato pavadinimo [63], tačiau lyginant lipazių savybes, atsižvelgiama ir į rezultatus, kuriuose apražoma *Rhizopus oryzae* lipazė (ROL), nes manoma, kad tai ta pati arba labai panaši lipazė.

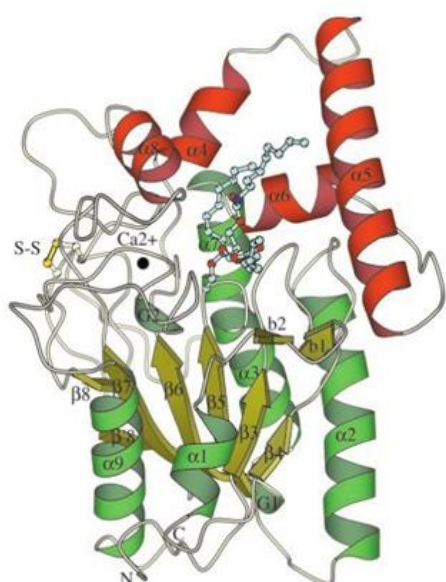
ROL yra 1,3-regiospecifinė lipazė, naudojama įvairių junginių hidrolizei ir sintezei, dažnai ir biodyzelino sintezei [64]. Tirpios ir kovalentiškai imobilizuotos ant anijoninės mainų dervos lipoazės temperatūrinis optimumas atitinkamai yra 35 °C ir 37 °C. Imobilizavus smarkiai pagerėja lipazės stabilumas aukštose temperatūrose, be to, nešiklis katalizuoja acilgrupės migraciją, kuri yra naudinga tais atvejais, kai reikalinga nespecifinė katalizė prie visų glicerolio anglies atomų [65]. Dėl acilgrupės migracijos įmanomos geros biodyzelino sintezės reakcijų išėigos naudojant 1,3-regiospecifinius fermentus, tokius kaip ROL [64]. Detaliai acilgrupės migracija aprašyta 1.6 skyriuje.

RNL taip pat pasižymi griežtesniu 1,3-specifiškumu nei dauguma kitų lipazių. *R. niveus* turi 2 lipazių tipus: Lipazė II gaunama iš lipazės I po proteolizės. Jos struktūra labai panaši į kitų lipazių, 55,7 % identiška RML. Turi stogelį, kuris nuo RML skiriasi tuo, kad Trp88, lemiantis aktyvaus centro atidarymą, pakeistas mažesne aminorūgštimi Ala89 [66]. Pasak Kohno, ši lipazė unikali, nes sudaryta iš dviejų nekovalentiškai susijungusių polipeptidinių grandinių A ir B. Ji klonuota ir ekspresuota mielėse *Saccharomyces cerevisiae* [67]. Optimalaus veikimo pH s 5,0–7,4, temperatūros optimumas 30–45 °C [63].

#### **1.2.5 *Pseudomonas* lipazės**

Aukščiau aprašytos lipazės yra grybinės kilmės. *Pseudomonas* yra gram-neigiamų bakterijų gentis, kuriai šios apžvalgos rengimo metu priklausė 225

bakterijų rūšys [68]. Dėl savo aktyvumo šarminėje terpėje, tolerancijos aukštomis temperatūroms ir stabilumo organinėje terpėje *Pseudomonas* lipazės dažnai naudojamos pramonėje, pavyzdžiui, detergentų priedams ir raceminių junginių atskyrimui [69]. Dažnai naudojama *Pseudomonas aeruginosa* lipazė, kurios tretinė struktūra nustatyta 2000 m. Nardini ir kolegų, yra prototipinė 1.1 bakterinių lipazių šeimos narė, todėl išvados apie jos sandarą ir regio- bei stereoselektyvumo savybes gali būti bendrai taikomos visam 1.1 bakterinių lipazių šeimai, tame tarpe ir *Pseudomonas fluorescens* (PFL) [70]. *Pseudomonas aeruginosa* lipazės (PAL) tretinė struktūra pateikta 1.6 pav. Ši lipazė turi atskirą kišenę kalcio jonui surišti. Oktraedriškai koordinuojamas kalcio jonas stabilizuoja kilpą, kurioje yra katalitinis histidinas [70].



1.6 pav. *Pseudomonas aeruginosa* lipazės struktūra [70].

*Pseudomonas fluorescens* (SIK W1) yra psichrotropinė bakterija, randama neapdorotame piene, ji produkuoja ypatingai atsparią aukštomis temperatūroms lipazę, kuri yra aktyvesnė vidutinio ir trumpo grandinės ilgio triacilglicerolių atžvilgiu [71]. PFL yra aktyvi plačiame pH intervale (3–11), termostabili, temperatūrinis optimumas 55 °C [72], atspari metanolui [47], ją naudojant galima gauti gana dideles biodyzelino išeigas (>90 %) betirpiklėje aplinkoje [73]. PFL tretinei struktūrai suformuoti ir stabilizuoti reikalingi

kalcio jonai [74]. Esant vidutinėms fermento koncentracijoms, PFL yra linkusi agreguoti į bimolekulines struktūras (apie 66 kDa molekulinės masės), kurios yra stabilesnės už monomolekulines, jų  $K_M$  (sviesto rūgšties etilo esteriu) daug didesnis, lengviau aktyvuojamos sąlyčio paviršiumi [75].

*Pseudomonas mendocina* lipazė (PML), kaip ir kitos bakterinės lipazės, apibūdinamos skirtingais tipais pagal ją sintetinantį kamieną. Pavyzdžiui, parodyta, kad *Pseudomonas mendocina* PK-12 CS lipazė skiriasi nuo kitos *Pseudomonas mendocina* detergentinės lipazės [76]. PK-12 CS lipazė atspari nejoninėms paviršiaus aktyvumo medžiagoms (Triton X-100, Tween-80), metalų jonams, organiniams tirpikliams, specifiskesnė natūraliems aliejams ir ilgagrandžiams nei trumpagrandžiams trigliceridams [76, 77]. Parodyta, kad Lietuvos Biochemijos institute išskirta *Pseudomonas mendocina* 3121-1 kamieno lipazė ne tik atspari nejoninėms paviršiaus aktyvumo medžiagoms (įvairiems Tween), bet jas priima kaip substratus ir hidrolizuoja, todėl šiuo atveju Tween'ai negali būti naudojami substratų emulsinimui [77]. Šios lipazės molekulinė masė 30 kDa, ji formuoja bimolekulinius agregatus, optimali temperatūra 50 – 65 °C (priklausomai nuo substrato, aukštesnė – natūraliems substratams), pH optimumas 7,2 – 7,5 [78].

### **1.3 Lipazių aptikimo ir aktyvumo nustatymo metodai**

Lipazių aktyvumo išmatavimui ir aptikimui naudojami metodai pagal detekcijos principą gali būti skirstomi į: 1) titrimetrinius; 2) spektroskopinius (fotometrinius, fluorimetrinius, infraraudonos šviesos spektroskopija); 3) chromatografinius; 4) radioaktyvių junginių panaudojimo; 5) sąlyčio paviršiaus tenziometrinius; 6) turbidimetrinius; 7) konduktometrinius; 8) imunocheminius; 9) mikroskopinius. Fizikocheminiais metodais stebimas reakcijos produkto susidarymas, substrato išnykimas ar emulsijos praskaidrėjimas, imunologiniais - lipazių buvimas nustatomas nepriklausomai nuo jų lipolizinio aktyvumo [79–81].



Lipazių aktyvumo nustatymui patartina naudoti reakciją, kuo panašesnę į tą, kuriai ketiname taikyti lipazes. Hidrolizės reakcijos dažniausiai vykdomos vandeniniuose tirpaluose, o esterinimo ir peresterinimo – organinėje terpėje [21].

### **1.3.1 Lipazių aptikimas kietoje terpėje**

Augimo terpėje lipolizė stebima tiesiogiai keičiantis substrato išvaizdai, pavyzdžiui, ant petri lėkštelių užpiltoje augimo terpėje, kurioje emulsintas tributirinas ar trioleinas, lipazių aktyvumas aptinkamas susiformavus skaidriam ratilui aplink kolonijas [82]. Vizualiam lipolizinio aktyvumo aptikimui palengvinti terpių sudėtyje gali būti naudojami dažai – indikatoriai, kurie keičia spalvą kintant pH. Vykstant lipolizei susidaro laisvos RR ir aplinkos pH krenta, todėl pakinta spalva aplink kolonijas. Tinkami dažai – Viktorijos mėlis B (CAS nr. 2390-60-5), Nilo mėlio sulfatas (CAS nr. 3625-57-8) fluorescuojantis dažas rodaminas B ir kiti, aprašyti Shelley, Kouker ir Hasan [80, 83, 84]. Metodas tampa jautresniu, kai vietoj įprastinio agarų su trigliceridų substratais naudojamas kiaušinio baltymo agaras (turi lipoproteino lipoviteleno) [85].

### **1.3.2 Titrimetrija**

Titrimetrija - nebrangus ir patogus metodas, naudojamas lipazių aktyvumui ir specifiškumui apibūdinti bei aktyvavimo paviršiumi reiškiniai tirti. Lipazės aktyvumas matuojamas maišant natūralių ar sintetinių triacilglicerolių emulsiją ir palaikant pastovų pH, o dėl lipolizės išsiskiriančias RR neutralizuojant (titruojant) natrio šarmu. [86]. Vienas lipolizinio aktyvumo vienetas apibrėžiamas kaip fermento kiekis, išlaisvinantis 1 mol RR per minutę [30].

Analizės jautrumą gali pagerinti substratų emulsinimas ultragarsu ar naudojant emulsiklius. Šiuo metodu galima tirti lipolizinį aktyvumą, kai išsiskiria daugiau nei 0,1  $\mu\text{mol}$  riebalų rūgščių per minutę. Metodą riboja

tinkamo analizei pH intervalas (pH turi būti didesnis arba lygus nei menamas karboksirūgšties pKa) [86].

### 1.3.3 Kolorimetrinė analizė

Kolorimetriniai metodai leidžia lipazių aktyvumo tyrimus atlikti greičiau ir jautriau.

**Kolorimetrinė analizė substratais naudojant sintetinius karboksiesterius.** Dėl savo paprastumo ir galimybės nenutraukiamai sekti reakcijos eigą, sintetiniai substratai, yra labai dažnai naudojami lipoliziniam aktyvumui nustatyti. Jų hidrolizės produktai yra spalvoti arba lengvai paverčiami spalvotais.  $\beta$ -naftilo, *p*-nitrofenilo (*p*-NP), 2,4-dinitrofenilo karboksiesterių hidrolizės metu išsiskiria spalvoti alkoholiai, kurių koncentracija sekama spektrofotometriškai [79]. Populiariausi turbūt yra *p*-NP įvairaus RR grandinės ilgio esteriai. Geltonos spalvos *p*-nitrofenolio tirpalo sugertis matuojama 405-410 nm bangos ilgyje, 2,4-dinitrofenolio – 360 nm,  $\beta$ -naftolio koncentracija sekama sudarant raudonos spalvos kompleksus su diazo druskomis.

Nitrofenilo acilesterių trūkumai naudojant juos lipazės substratais:

- nėra saviti substratai, juos gali hidrolizuoti esterazės, kiti neišgrynintų preparatų fermentai;
- katalizinis tikrų lipazių virsmų skaičius su *p*-NP junginiais dažniausiai yra keletu eilių mažesnis nei su TAG-ais, nes *p*-NP esteriai yra antrinių alkoholių esteriai, o lipazės dažniausiai katalizuoja pirminių esterinių ryšių nutraukimą TAG-uose (sn-1 ir sn-3 padėtyse);
- šie esteriai yra jautrūs nefermentinei savaiminei rūgštinei ir bazinei hidrolizei (išskyrus ilgų grandinių *p*-NP esterius, sudarančius micles).

Tačiau *p*-NP esteriai, turintys skirtingo ilgio riebalų rūgščių grandinę, yra patogūs substratai greitam mikrobinių lipazių savitumo nustatymui (Beison et al., 2000).

Be šių dažnai naudojamų junginių, aprašytos ir kitos spalvotų junginių susidarymo reakcijos, detalesnį jų aprašymą galima rasti Hasan ir kt. apžvalgoje [80].

**Spalvotų reakcijos produktų kompleksų registravimas.** Organinėje terpėje dažnai naudojami divalenčiai metalai (pvz. varis), su kuriais kompleksus sudaro laisvos RR [87]. Taip pat naudojamas katijoninis dažas safraninas, rodaminas 6 G, parinaro rūgštis [79].

#### **1.3.4 Fluorimetrinė analizė**

Metodas pagrįstas fluorescencijos pokyčiu, atsirandančiu dėl lipazės katalizuojamos reakcijos, t.y. naudojami substratai, turintys fluoroforines grupes arba fluoescentinėmis žymėmis modifikuojami reakcijos produktai. Fluorimetrinė analizė vertinama dėl savo jautrimo ir galimybės nepertraukiamai matuoti reakcijos kinetiką.

Lyginant tarpusavyje įvairius fluorimetrinės analizės metodus, patikimiausia ir mažiausiai jautri reakcijos sąlygoms yra pertraukiama analizė, naudojant natūralius substratus, o reakcijos produktus modifikuojant fluoescentinėmis žymėmis. Trūkumas - pakankamai ilgai užtrunkantys ir kruopštumo reikalaujantys analizės etapai, dėl kurių apribojamas galimai išanalizuojamas mėginių kiekis. Nepertraukiama analizė, kurios metu matuojama fluoescentinės žymės savybių kaita, yra patogiausia kinetikos tyrimams. Šio metodo varianto trūkumai yra jautrumas reakcijos sąlygoms ir terpėje esantiems junginiams (detergentams ir baltymams). Be to, renkantis analizės metodą svarbu atsižvelgti ir į fluorescencijos reagentų kainą [88].

**Sintetinių substratų pavyzdžiai.** Lipazių aktyvumui nustatyti naudojami sintetiniai karboksiesteriai, turintys fluoroforines grupes: kumariną, nitrobenzoksadiazolą (NBD), rezorufiną ar pireną. Dažniausiai toje pačioje molekulėje yra ir fluorescencijos gesiklis (pvz., trinitrofenilamino acilgrupė), katalizavus substrato hidrolizę fluoroforas ir gesiklis atsiskiria vienas nuo kito ir palaipsniui didėja fluoroforo fluorescencija, kuri atspindi lipolizės eigą [79,

89]. Pagrindinis šių junginių trūkumas yra tas, kad lyginant su natūraliais lipazių substratais, šių sintetinių substratų molekulės struktūra sudėtinga, todėl ne visos lipazės gali efektyviai juos hidrolizuoti. Kai kuriais atvejais naudojami natūralūs TAG,  $\omega$ - padėtyje žymėti pireno grupe. Aptinkamas išsiskyrusių RR kiekis, tačiau reakcijos produktus reikia ekstrahuoti.

**Natūralių substratų pavyzdžiai.** Vertingas substratas - parinaro aliejus, kuriame daugiau nei pusę RR sudaro natūraliai fluorescuojanti 9,11,13,15-oktadekatetraeno rūgštis (parinaro rūgštis), jos fluorescenciją tirpale smarkiai padidina detergentai. Tačiau dėl parinaro aliejaus nestabilumo reikalingos neoksiduojančios reagentų laikymo ir reakcijos sąlygos – inertinė atmosfera, antioksidantai [90].

Fluorescuojančių junginių, naudojamų lipolizės analizei, įvairovė labai didelė, toli gražu ne visi pavyzdžiai detalai aprašyti, detalesnė informacija apie fluorescentinę analizę pateikta Beisson, Kovacs ir Smidt publikacijose [79, 91, 92]

### 1.3.5 Nefelometrija ir turbidimetrija

Turbidimetrijos metodas pagrįstas mėginio šviesos išsklaidymo intensyvumo matavimu. Kuo labiau išsklaidoma šviesa, tuo didesnis drumstumas (turbidiškumas). Nefelometrijoje matuojamas išsklaidytos šviesos intensyvumas tam tikru kampu nuo pirminio šviesos šaltinio spindulio, turbidimetrijoje – praėjusi per mėginį neišsklaidyta šviesa.

Kai lipolizė aptinkama kietoje terpėje ant agarų lėkštelių, dėl lipolizės išsiskyrus dalinai tirpioms vandenyje RR, aplink lipazes produkuojančių bakterijų kolonijas atsiranda skaidresnės agarų zonos. Tuo pačiu principu matuojamas ir trioleino ar paviršiaus aktyviųjų medžiagų (pvz. polisorbato, Tween®) emulsijos drumstumas tirpale [93]. Skaidant triacilglicerolių emulsiją, išsiskiria riebalų rūgštys, o joms sudarant netirpius kompleksus su kalcio druskomis, galima sekti tirpalo drumstumo pokytį [79].

### 1.3.6 Chromatografiniai metodai

Įvairūs chromatografiniai metodai naudojami lipidams ir TAG hidrolizės produktams aptikti. Dažniausiai naudojama dujų chromatografija (GC), aukšto slėgio skysčių chromatografija (HPLC), dujų-skysčių chromatografija ir plonasluoksnė chromatografija (TLC). Natūralių lipazės substratų atveju dujų chromatografija turi pranašumų prieš HPLC, nes HPLC naudojamų detektorių jautrumas tokiems junginiams yra žemas [80]. HPLC galima naudoti sintetinius substratus –  $\beta$ -naftillauratą ir *p*-nitrofenillauratą, renkantis atvirkštinių fazių kolonėlę [94].

Plonasluoksnė chromatografija yra labai dažnai naudojamas metodas įvairioms lipazių katalizuojamoms reakcijoms stebėti, lipazių specifiškumui apibūdinti, tačiau jis labiau tinkamas kaip palyginamasis metodas ir retai taikomas lipoliziniam aktyvumui nustatyti. Pagrindiniai šio metodo privalumai – gali būti naudojami natūralūs lipazių substratai, kurie, kaip ir jų produktai, lengvai aptinkami dažant jodu ar apanglinant. Pagrindiniai trūkumai – ribotas tikslumas ir didelio kruopštumo reikalaujančios procedūros. Tačiau galima ir kiekybinė TLC analizė - ji dažniausiai atliekama densitometriniais, kartais audioradiografiniais metodais (su radioaktyviai žymėtais triacilgliceroliais) [79].

### 1.3.7 Imunologiniai metodai

Imunologiniai metodai leidžia aptikti lipazės biologinėse terpėse, nepaisant to, ar jos aktyvios, ar ne. Imunofermentinės analizės metu (angl. ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) naudojami antikūnai (dažniausiai polikloniniai), prijungti prie kieto pagrindo, pvz., PVC mikrotitratoriaus plokštelės. Lipazė yra antigenas ir reaguoja su šiais antikūnais (surišėjais), vėliau dedama detektorinių antikūnų (dažniausiai monokloninių, atpažįstančių tam tikrą antigeno epitopą), antigeno kiekis nustatomas pagal antrinio antikūno, žymėto biotinu ar fluorescuojančia žyme, kiekį. Lipazių

biotinilimas ne visuomet paprastas, gali būti skirtingų jungimosi ypatumų [79].

Imunobloto analizė – gelelektroforezės taikymas kartu su imunocheminiais aptikimo metodais lipazių molekulinei masei ir antikūnų specifiškumui tam tikrai lipazei nustatyti [79].

### **1.3.8 Wilhelmy plokštelės metodas**

Šis metodas, pavadintas jį atradusio mokslininko L. Wilhelmy garbei, pagrįstas substratų - grynų monomolekulinių plėvelių - paviršiaus slėgio vandens / oro sąlyčio paviršiuje matavimu. Paviršiaus slėgis proporcingas paviršiaus įtampai. Išvirkštus lipazę po šiuo monosluoksniu, jo įtampa mažėja dėl tirpių produktų susidarymo. Teflono ar platinos užtvara, įsiterpusi į lipidinę fazę, juda, palaikydama pastovų plėvelės paviršiaus slėgį. Reakcijos kinetika stebima sekant užtvaros judėjimą. Šiuo metodu galima išmatuoti ir kontroliuoti tokius svarbius veiksnius kaip paviršiaus slėgis, substrato molekulinis plotas [80].

### **1.3.9 Kiti lipazių aktyvumo nustatymo metodai**

Verta paminėti ir kitus lipazių aktyvumo nustatymo metodus, kurie dažnai remiasi įdomiais principais ir gali turėti privalumų tiriant tokias sritis kaip fermentų veikimo mechanizmai, substratų nanostruktūros pokyčiai, lipazių aktyvumas *in vivo*. Tačiau norint lipazes naudoti kaip katalizės įrankius, tyrėjai šių metodų vengia dėl jų sudėtingumo, laiko sąnaudų bei brangios aparatūros.

**Radiometriniai metodai** yra jautriausi, tačiau reikalingi brangūs substratai su radioaktyviomis žymėmis, analizė yra pertraukiama, nes reikia atskirti žymėtus substratus nuo produktų, be to, reikalauja padidinto saugumo [80].

**Atominės jėgos mikroskopija** galima stebėti lipazių poveikį mišrių lipidų bisluoksniams, registruojant gilius defektus turinčias sritis – „skyles“.

Sekant „skyllių” didėjimo priklausomybę nuo trukmės išmatuojamas lipazės aktyvumas. Šiuo metodu patogu tirti nanomatmenų sistemas, lipazių aktyvumą skirtingos struktūros monosluoksniuose (pavyzdžiui, su defektais) [95].

**Furje transformuota infraraudonoji spektroskopija** taikoma matuoti atvirkštinių TAG micelių hidrolizei. Registruojamos riebalų rūgščių esterių ir laisvų riebalų rūgščių smailės (atitinkamai esant  $1751\text{ cm}^{-1}$  ir  $1715\text{ cm}^{-1}$ ) [96].

**Metodai, kuriuose nustatomas išsiskyrusio glicerolio kiekis.** Iš TAG-ų išsiskyręs glicerolis gali būti nustatomas įvairiais metodais: oksiduojant iki spektroskopiškai nustatomo formaldehido; taikant bioluminescenciją - naudojant luciferino - luciferazės kompleksą; glicerolį fosforilinant iki glicerolio-3-fosfato, kuris virsta dihidroacetono fosfatu ir galiausiai vandenilio peroksidu, kuris nustatomas spektrofotometriškai su peroksidaze; kiekybiškai nustatant iš sintetinių karboksiesterių išsiskiriantį spalvotą ar fluorescuojantį alkoholį, taip pat HPLC ar dujų chromatografijos metodais [79]. Reikia paminėti, kad laisvo glicerolio nustatymas nėra dažnai naudojamas lipazių aktyvumui išmatuoti, nes visos trys acilgrupės retai skeliamos tos pačios lipazės, be to, paskutinė riebalų rūgštis skeliama reakcijai artėjant prie pusiausvyros, todėl šiuo būdu neįmanoma nustatyti pradinio reakcijos greičio [80].

**Fermentinė analizė** kol kas nėra labai efektyvi dėl terpėje esančių kitų fermentų sąveikos, nefermentinių paraleliai vykstančių reakcijų, fermentinių reakcijų pH nesuderinamumo, inhibicijos (slopinimo) kai kuriomis riebalų rūgštimis. Fermentinės lipazių analizės pavyzdžiai: *Beneckea harveyi* liuciferazė švyti esant laisvoms RR ir yra ypač savita miristino rūgščiai. Esant linolo rūgščiai lipoksigenazės, sudaro hidroperoksidinį darinį, kuris gali būti aptinkamas su tiocianatu (raudonas kompleksas) ar matuojamas deguonies sunaudojimas. Naudojant acil-KoA sintetazę, acil-KoA oksidazę, gaunamas enoil-KoA ir peroksidas, kuris esant fenolio ir aminoantipirino verčiamas į raudoną chinoninį dažą [79, 80].

***In situ* aptikimas šviesos ir elektroniniu mikroskopu.** Gyvūnų audiniuose lipazę galima aptikti inkubuojant ląsteles su trioleinu, vėliau veikiant švino druskomis. Suformuojami netirpūs švino muilai, kurie matomi mikroskopu. Tween'ų hidrolizės produktai formuoja didesnes daleles, tačiau tween'ai nėra saviti lipazės substratai [97, 98].

**Elektrinio laidumo tyrimai** turi daug trūkumų, nes didėjantis terpės elektrinis laidumas, išsiskiriant riebalų rūgštims, labai priklauso nuo temperatūros, o jautrumas yra pakankamas tik naudojant triacetiną, kuris nėra labai tinkamas lipazių substratas [79]

**Paviršiaus akustinės bangos jutiklis** – metodas pagrįstas paviršiaus laidumo akustinėms bangoms pokyčiu išsiskyrus riebalų rūgštims (substratas – trioleinas) [99].

**Kabančio aliejaus lašo metodas** remiasi aliejaus-vandens paviršiaus įtempimo pokyčių matavimu. Paviršiaus įtampa mažėja hidrolizuojantis aliejui ir ant lašo paviršiaus kaupiantis hidrolizės produktams. Dėl to keičiasi lašo profilis, kuris stebimas automatizuotu, dabar komerciškai prieinamu tenziometru. Panašiomis sąlygomis galima stebėti lipazių jungimąsi prie aliejaus-vandens sąlyčio paviršiaus [80].

#### **1.4 Tirpiklio pasirinkimas lipazių katalizuojamoms reakcijoms**

Reakcijų, kurių substratai ribotai tirpsta vandenyje ar vanduo yra reakcijos produktas, išeigos vandeninėse sistemose dažniausiai yra žemos [100]. Parodyta, kad lipazių katalizuojamos reakcijos (pvz. interesterinimas) gerai vyksta tokiuose tirpikliuose kaip dioksanas, *n*-heksanas, *n*-heptanas, acetonitrilas, acetonas, izooktanas, *tret*-butanolis ir *tret*-pentanolis [101].

Žinoma, įdomiausia strategija yra reakcija be tirpiklio, tačiau kai to neįmanoma įgyvendinti, svarbiausia yra pasirinkti tinkamą tirpiklį [102]. Vertinant tirpiklių tinkamumą reakcijoms, dažniausiai remiamasi tirpiklio savybe pasiskirstyti tarp *n*-oktanolio ir vandens. Ši savybė išreiškiama  $\log P$



vertėmis:  $P$  yra tirpiklio pasiskirstymo koeficientas tarp 1-oktanolio/vandens (dažniausiai naudojamų tirpiklių  $\log P$  vertės pateiktos 1.3 lentelėje) [103]. Siekiant pasirinkti terpę, kuri neturėtų žalingos įtakos fermentui ir jis būtų aktyvus ilgą laiką, dažniausiai lipazių katalizuojamoms reakcijoms rekomenduojami tirpikliai, kurių  $\log P$  vertės  $> 3$ , pvz.  $n$ -heksanas ir  $n$ -heptanas. Šie tirpikliai plačiai naudojami tokioms reakcijoms, kaip lipazių katalizuojama aliejaus ir riebalų restruktūrizacija [102]. Tačiau bendra taisyklė, teigianti, kad tirpikliai, kurių  $\log P > 3$  yra tinkamiausi biokatalizei, ne visada galioja, nes ši taisyklė iš esmės išvesta iš tokių eksperimentinių reakcijų rezultatų, kuriose nepoliniai substratai reaguodami sudaro dar labiau nepolinius produktus, t.y. šios taisyklės pagrindas yra reakcijos produktų ir tirpiklių poliškumo suderinamumas [104]. Parodyta, kad nei tirpiklio apoliškumas, nei galimybė maišytis su vandeniu nėra tiesiogiai susiję su vandens mikrokiekiais disponuojančios biokatalizės rezultatais, o tirpiklis turėtų būti pasirinktas substratų ir produktų prigimties (poliškumo) kontekste [105, 106].

1.3 Įvairių tirpiklių, naudojamų lipazių katalizuojamoms reakcijoms,  $\log P$  vertės [103].

Tirpiklis	$\log P$	Tirpiklis	$\log P$
$n$ -dekanas	+5,6	Piridinas	+0,71
$n$ -heptanas	+4,0	tetrahidrofuranas	+0,49
$n$ -heksanas	+3,5	acetonas	-0,26
toluenas	+2,5	acetonitrilas	-0,36
benzenas	+2,0	etilmetilketonas	-0,80
2-metil-2-butanolis	+1,3	dimetilformamidas	-1,0
metil- <i>tert</i> -butileteris	+0,94	dioksanas	-1,1
<i>tert</i> -butanolis	+0,83	dimetilsulfoksidas	-1,3

Poliniai tirpikliai nėra tinkami reakcijoms, kurių substratai labai skiriasi savo poliškumu (pavyzdžiui, cukrų ir riebalų rūgščių esterių sintezė). Hidrofilinė molekulė (sacharidas) turi reaguoti su lipofiline (RR). Šiuo atveju tirpikliai su  $\log P > 3$  netinka, nes angliavandeniai tokioje terpėje tirpsta labai prastai arba netirpsta visai. Geras kontaktas tarp substratų yra reikalingas, todėl

pasirinktas tirpiklis turi bent dalinai juos tirpinti. Reikia rinktis tirpiklius su žemesnėmis  $\log P$  vertėmis, pvz. acetonitrilas, *tret*-butanolis, 2-metil-2-butanolis (*tret*-amilo alkoholis) ar etil-metilketonas. Tretiniai alkoholiai yra vienas geresnių pasirinkimo variantų, nes jie nėra tinkami substratai daugumai lipazių (priešingai, nei pirminiai ir iš dalies antriniai alkoholiai), nepasižymi ryškiu fermento inaktyvavimu, o įvykus reakcijai dažniausiai juos nesunku pašalinti [102].

Kai gali susidaryti keli reakcijos produktai, parinkus tinkamą tirpiklį, reakcijos pusiausvyrą galima pastumti link pageidaujamo produkto. T.y. poliniuose tirpikliuose susidarius poliniams produktams, jie lengvai solvatuojami, todėl toks tirpiklis veikia kaip produkto talpykla. Priešingai, nepoliniuose tirpikliuose polinis produktas solvatuojamas prastai, todėl jis linkęs reaguoti toliau, jei įmanoma, kol susidaro pakankamai nepolinis produktas, kuris lengvai ištirpinamas [104].

Galiausiai renkantis tirpiklį labai svarbu įvertinti jo toksiškumą. Pavyzdžiui, ankstyvojoje literatūroje piridinas buvo dažnai minimas kaip tinkamas tirpiklis lipazių katalizuojamoms reakcijoms atlikti [107], tačiau jo reikėtų vengti dėl toksiškumo [102].

Nors organiniai tirpikliai ir gali būti panašūs į hidrofobinę mikroaplinką, esančią gyvuose organizmuose (pvz. biologinėse membranose), be abejo jie nėra natūrali terpė fermentams, todėl logiška būtų įvertinti tirpiklio sukeltus konformacinius pokyčius, kurie gali sumažinti fermentų katalitinį veiksmingumą [108]. Rentgenostruktūrinė subtilizino acetoritrile bei chimotripsino heksane analizė parodė, kad šių fermentų trimatė struktūra tirpikliuose reikšmingai nesiskiria nuo jų struktūros vandeniniuose tirpaluose. Nors bevandenėje aplinkoje natyvi konformacija ir nėra termodinamiškai palanki, fermentas neišsivynioja dėl kinetinių barjerų [109]. Iš tiesų vandens nebuvimas sumažina baltymo lankstumą. Su vandeniu besimaišančių organinių tirpiklių ir vandens mišiniuose arba su vandeniu nesimaišančių tirpiklių atveju

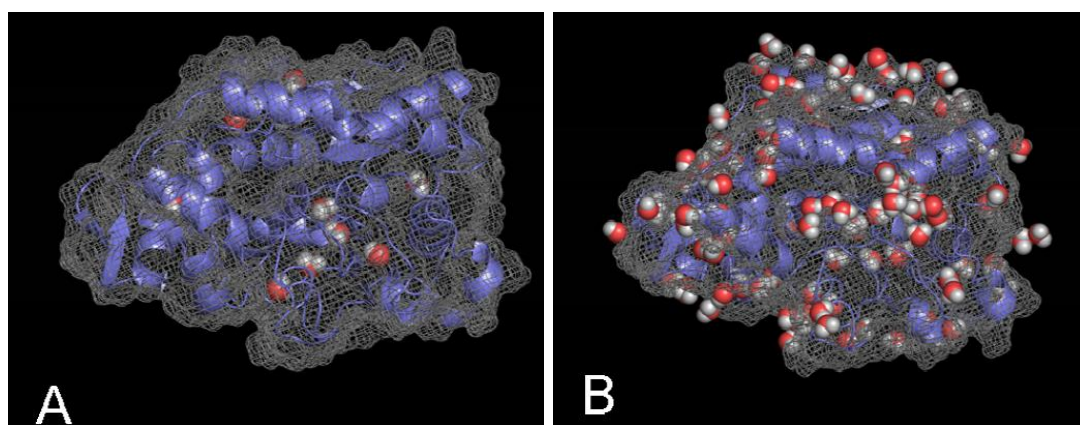
esant didelėms vandens aktyvumo vertėms, baltymai tampa lankstesni, bet mažiau stabilūs [108]. CALB visuose tirpikliuose pasižymėjo mažesniu šerdies ir aktyvaus centro lankstumu, bet didesniu baltymo paviršiuje esančių aminorūgščių lankstumu. Bendras lankstumas žymiai didesnis vandenyje, nei organiniuose tirpikliuose [110]. Taigi baltymų konformacija nelinkusi pasikeisti organiniuose tirpikliuose, priešingai, gryninant fermentus liofilizacijos metu dažnai pakinta antrinė baltymų struktūra (sumažėja  $\alpha$ -spiralių, padaugėja  $\beta$ -klosčių). Baltymo struktūrą apsaugojantį poveikį liofilizavimo metu turi metoksipolietilenglikolis, su kuriuo liofilizavus baltymus juos galima netgi ištirpinti kai kuriuose tirpikliuose iki 0,2 mg/ml [108].

Vis labiau domimasi joninių skysčių (JS) - jonų porų, kurios yra skystos kambario temperatūroje - panaudojimu biokatalizei. Tačiau pramonėje ši katalizė dar nevykdoma dėl aukštos šių junginių kainos ir gali būti realiai pritaikyta tik didelės pridėtinės vertės molekulėms sintetinti [102]. Fermentai suspenduoti JS lieka stabilūs ir aktyvūs net jei jie nėra stabilūs ar aktyvūs įprastiniuose organiniuose tirpikliuose. JS dėka galima atlikti polinių substratų reakcijas nevandeninėje terpėje, atsiveria didesnės galimybės efektyviai vykdyti reakcijas su tokiais substratais, kaip peptidai, angliavandeniai, nukleotidai ir kt. Tačiau tam, kad procesą galima būtų vadinti „žaliu“ ir taikyti pramonėje, reikia ieškoti geresnių produktų (ypač polinių nelakių medžiagų) išskyrimo būdų ir efektyvaus antrinio JS panaudojimo ir gryninimo [111].

### **1.5 Vandens įtaka lipazių katalizuojamoms reakcijoms**

Fermentams yra reikalingas nedidelis vandens kiekis, kad būtų išlaikoma jų aktyvi erdvinė konformacija. Jis reikalingas net ir tuomet, kai fermentas yra prisijungęs prie nešiklio [109, 112]. Vandens molekulės lemia baltymo struktūros vientisumą, aktyvaus centro poliškumą ir stabilumą. Jos sąveikauja su poliniais fermento aminorūgščių radikalais, kurie kitu atveju sąveikautų vienas su kitu, sukurdami neteisingą konformacinę struktūrą. Vanduo gali apriboti hidrofobinių substratų tirpumą aplink fermentą [113].

Prie fermento prisijungęs vanduo tarsi atlieka tepalo funkciją. Visiškai sausi fermentai yra neaktyvūs, tačiau fermentai organiniuose tirpikliuose, apsupti didelio vandens kiekio, linkę denatūruoti [114]. Lipazės aktyvumui būtinas vandens kiekis labai priklauso nuo jos prigimties. Kai kurie tyrėjai būtinu vandens kiekiu laiko viengubą vandens molekulių sluoksnį aplink fermento molekulę, kiti – minimalius kiekius, įsiterpusius į fermento molekulę [100]. Molekulinio modeliavimo eksperimentais su CALB nustatyta, kad visos iš išorės fermentą supančios vandens molekulės vandeninėje terpėje yra judrios ir greitai pasikeičia, o cikloheksane jos suformuoja susisiekiantį vandens tinklą aplink visą fermento molekulę ir yra mažai judrios (1.7 pav.). Gilesniuose sluoksniuose esančios devynios vandens molekulės yra nejudrios tiek vandenyje, tiek cikloheksane [110].



1.7 pav. Mažesnio judrumo vandens molekulių išsidėstymas aplink CALB struktūrą ir jos viduje (A) vandenyje ir (B) cikloheksane [110]

Esterinimo/hidrolizės reakcijų metu vandens kiekis veikia reakcijos pusiausvyrą, taip pat produktų pasiskirstymą terpėje. Vanduo ne tik lemia aktyvaciją, bet ir prisideda prie fermentų termo-inaktyvacijos. Esant aukštomis temperatūroms fermentai stabilesni mažai vandens turinčiose terpėse nei vandeniniuose tirpaluose [115].

Taigi vanduo gali turėti tiek teigiamą, tiek neigiamą įtaką lipazių katalizuojamoms reakcijoms. Pagrindiniai veiksniai paminėti 1.4 lentelėje.

1.4 lentelė. Vandens įtaka lipazių katalizuojamoms reakcijoms organiniuose tirpikliuose [21].

<b>Teigiama vandens įtaka</b>	<b>Neigiama vandens įtaka</b>
Bendra aktyvacija dėl padidėjusio fermento vidinio lankstumo	Slopinimas (inhibicija) - trukdis prisijungti substratą
Padidėjęs aktyvaus centro poliškumas	Sudaro difuzijos barjerą hidrofobiniams substratams
Padidėjęs protono laidumas	Skatina hidrolizę, kuri konkuruoja su pasirinkta reakcija (esterinimu, peresterinimu)
Dalyvauja kaip substratas (pagerina tik hidrolizę)	

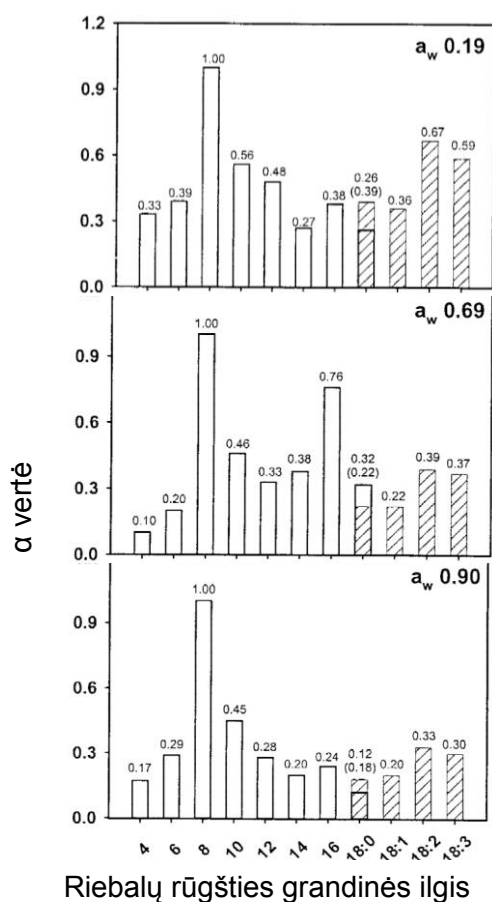
Organiniuose reakcijų mišiniuose esančiam vandeniui kiekybiškai įvertinti Halling pasiūlė naudoti termodinaminio vandens aktyvumo ( $a_w$ ) dydį, nes jis gerai koreliuoja su vandens kiekiu, prisijungusiu prie fermento, ypač su vandeniū nesimaišančių tirpiklių atveju [116, 117]. Vandens aktyvumas kinta nuo 0 visiškai sausoje sistemoje iki 1 vandeniū įsotintoje sistemoje ir pusiausvyros sąlygomis visose fazėse yra lygus [21].

Norint pasiekti efektyvią katalizę, kontroliuojant vandens kiekį sistemoje, reikėtų rasti aukso vidurį tarp hidrolizės sumažinimo ir aktyvumo padidinimo, jis turėtų būti nustatytas konkrečiai reakcijos sistemai [73, 118]. Bendru atveju, organinei biokatalizei geriausiai tinka su vandeniū nesimaišantys hidrofobiniai tirpikliai ir vandens kiekis šiek tiek žemiau įsotinio ribos [109]. Tokiuose tirpikliuose  $a_w$  labai staigiai didėja link vieneto esant mažoms vandens koncentracijoms (vandens molekulėms  $<1\%$ ). Dvifazėse sistemose, kuriose yra atskira vandens fazė,  $a_w$  iš esmės lygus vienetui. Esant mažoms  $a_w$  vertėms, prisijungęs prie fermento vandens kiekis nepriklauso nuo tirpiklio tipo, tačiau  $a_w$  retai naudojamas eksperimentuose nes jis nėra paprastai ir greitai nustatomas [100].

Deja, ne visi fermentai paklūsta bendroms taisyklėms. Pavyzdžiui, CALB peresterinimo reakcijos greitis mažėja didėjant vandens kiekiui sistemoje, o didžiausios išeigos pasiekiamos bevandenėje terpėje [119–121]. Žinoma, yra ir

prieštaringų duomenų: kai kurie autoriai CALB esterinio reakcijai nurodo didesnes maksimalaus aktyvumo  $a_w$  reikšmes (0,69-0,90), tokias pačias, kaip ir *Candida rugosa* lipazei, o *Rhizomucor miehei* lipazei  $a_w$  0,9 [122]. Lipozyme TL IM preparato atveju peresterinimo aktyvumas nekinta  $a_w$  intervale 0,113-0,529, o didesnis  $a_w$  lemia didesnę laisvų RR susidarymą (hidrolizės reakcija) [38].

Vandens aktyvumas lemia ne tik fermento aktyvumą, bet ir reakcijos specifiškumą: pavyzdžiui, lipazių atrankumo RR profilis keičiasi keičiantis  $a_w$  (1.8 pav.). Šie pokyčiai gali būti nulemti fermento plastiškumo pokyčių ir įtakos, kurią substrato pasiskirstymui heterogeninėje sistemoje gali turėti nešiklis ir pastovios fazės poliškumas kintant  $a_w$  [122]. Taigi reakcijos sistemoje esantis vanduo, fermento nešiklis ir tirpiklis sąveikauja tarpusavyje, vandeniui pasiskirstant tarp katalizatoriaus, nešiklio ir tirpiklio [100].



1.8 pav. Santykinės selektyvumo konstantos ( $\alpha$  vertės) įvairaus ilgio ir nesotumo laipsnio RR esterinimo 1,3-propandioliu reakcijoms, katalizuojamoms *B. cepacia* lipazės, imobilizuotos ant anijoninės dervos [122].

## 1.6 Acilglicerolių acilgrupės migracija

Acilgrupės migracija (acilmigracija) acilgliceroliuose (gliceriduose) ir kituose polioliuose, kurių dalis hidroksilgrupių yra acilinta, pradėta tirti jau seniai [123]. Centrinis glicerolio anglies atomas yra prochiralinis, todėl diacilgliceroliai (DAG) kaip ir monoacilgliceroliai (MAG) turi po tris izomerines formas: *sn*-1,2-DAG, *sn*-1,3-DAG ir *sn*-2,3-DAG, taip pat *sn*-1-MAG, *sn*-2-MAG ir *sn*-3-MAG. Šie izomerai gali būti atskiriami fermentiškai, metaboliškai ir chromatografiškai, tačiau fizikocheminės enantiomerų *sn*-1,2-DAG ir *sn*-2,3-DAG bei *sn*-1-MAG ir *sn*-3-MAG savybės nesiskiria, todėl dažniausiai jie supaprastintai žymimi kaip vienas izomeras: 1,2-DAG bei 1-MAG [124]. Taip jie bus žymimi ir šiame darbe.

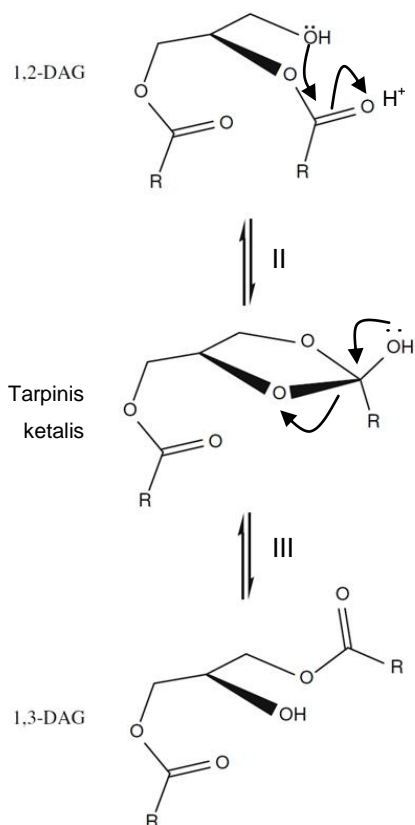
Migruojant acilgrupei, ji keičia padėtį glicerido karkase, susidarant kitam glicerido *regio*-izomerui ir ilgainiui nusistovi glicerido tipui būdinga pusiausvyra. MAG atveju pusiausvyra nusistovi kai 2-MAG ir 1-MAG santykis yra 1:9, o ilgagrاندžių DAG mišinyje nusistovėjus pusiausvyrai 1,2-DAG ir sudaro apie 30 – 40 % [124, 125]. Ši pusiausvyra gali nežymiai pakisti ištirpinus dalinius gliceridus tirpiklyje [126].

### 1.6.1 Acilgrupės migracijos mechanizmas

Emil Fischer [127] ir Serdarevich [125] pasiūlytas skystų 2-MAG ir 1,2-DAG acilgrupės migracijos mechanizmas. Acilgrupė migruoja susidarant penkianariam intramolekuliniam tarpiniam junginiui, kuomet pirminės hidroksilgrupės deguonies atomas nukleofiliškai atakuoja antrinę karbonilgrupę. Vėliau seka žiedo atsidarymas, susiformuojant termodinamiškai stabilesniems, nešakotiems MAG ir DAG izomerams (1-MAG ir 1,3-DAG) (1.9 pav.).

Izomerizaciją lemia karboksilinės anglies elektrofiliškumas ir steriniai efektai, be to, pirminė hidroksilgrupė yra reaktingesnė, nei antrinė [128]. Acilgrupės migracija nėra nei endoterminis, nei egzoterminis procesas, taigi jis

yra varomas entropijos pokyčių. Parodyta kad 1,3-DAG ir 1-MAG turi didesnę rotacinę, vibracinę ir sukimosi laisvę nei atitinkami jų izomerai [124].



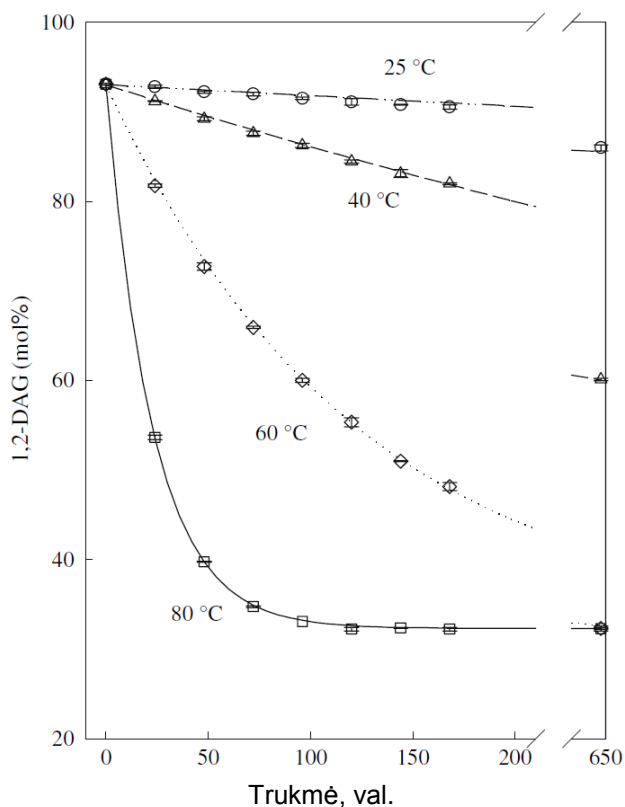
1.9 pav. Siūlomas acilmigracijos mechanizmas. I etapas (nepavaizduotas) – karbonilinis anglies atomas tampa elektrofiliškesniu, esant protonui, II – šalia esantis hidroksilgrupės deguonis nukleofiliškai atakuoja karbonilgrupės anglį, susidaro penkianaris žiedinis tarpinis junginys (ortoesteris, arba ketalis), III – Hidroksilgrupės deguonis vėl nukleofiliškai atakuoja anglį, įtemptas žiedas atsidaro ir susidaro 1,3-digliceridas. R – alkilgrupė. [124, 125]

### 1.6.2 Veiksniai, turintys įtakos acilgrupės migracijos greičiui

MAG ir DAG acilmigracijos greitis priklauso nuo temperatūros, tirpiklio, ją katalizuojančių rūgščių ir bazių bei migruojančios grupės prigimties [124]. Bendru atveju, digliceridų acilmigracijos greitis turėtų būti mažesnis, nei monogliceridų [125].



**Temperatūra.** Didėjant temperatūrai acilmigracijos greitis didėja, tačiau pusiausvyra lieka nepakitusi. 1.10 pav. po 650 val. pusiausvyra pasiekta 60 °C ir 80 °C laikytuose mėginiuose



1.10 Temperatūros įtaka acilgrupės migracijai 1,2-DAG virstant 1,3-DAG [124].

Tirpiklis taip pat turi įtakos acilgrupės migracijos greičiui. Napoliniuose tirpikliuose izomerizacija vyksta greičiau, nei poliniuose [126]. Millqvist Fureby teigimu, acilmigracija greičiau vyksta neprotininiuose hidrofobiniuose ir protoniniuose hidrofiliniuose tirpikliuose, tuo tarpu monooleinas stabilesnis dipoliniuose hidrofobiniuose tirpikliuose. Taigi greita acilmigracija vyksta sausuose alifatiniuose angliavandeniliuose ir su vandeniu besimaišančiuose alkoholiuose [129].

**Tirpiklio priedai.** Terpei tampant vidutiniškai poline (į nepolinius tirpiklius priedant alkoholių, vandens, monooleino) acilgrupės migracija sulėtėja (į izooktaną ar MTBE pridėjus etanolio acilmigracija sulėtėja apie 50 %). Į tirpiklius pridėjus vandens, acilmigracija sulėtėja, tačiau, jei kartu

pridedama riebalų rūgščių ar baltymų, didėjant vandens aktyvumui, acilgrupės migracija greitėja. Šiam reiškiniui paaiškinimų nepasiūlyta [129]. Kiti autoriai taip pat teigia, kad esant lipazių, vanduo pagreitina acilgrupės migraciją, tačiau šiuo atveju vandens vaidmuo yra dalyvauti hidrolizės reakcijoje ir paversti 1,2-DAG į 2-MAG, kuris migruojant acilgrupei virsta 1-MAG be jokios vandens įtakos, tuomet šis 1-MAG lipazės esterinamas į 1,3-DAG [126]. Pastebėta, kad 2-MAG izomerizaciją pagreitina sojų aliejus [124].

**Rūgščių ir bazių įtaka.** Rūgštys ir bazės palengvina pradinę pirminės hidroksilgrupės nukleofilinę ataką 1.9 pav. [124].

**Fermentų nešikliai.** Tiriant ir taikant fermentus įvairioms gliceridų konversijoms, svarbi fermentų imobilizacijai naudojamų nešiklių įtaka acilmigracijai, nes ji gali lemti tokių reakcijos produktų susidarymą, kurių nebūtų tikimasi, naudojant specifines lipazes [64]. Neutralios medžiagos, priešingai nei krūvį turintys nešikliai, beveik neturi įtakos acilmigracijai. Ją skatina nešiklio paviršiuje esančios krūvį turinčios grupės: vyksta rūgštinė ar bazinė katalizė arba tarp nešiklio (pvz. silikagelio) ir tarpinio junginio (ketalio) sudaromas koordinacinis ryšys, susiformuoja ortoesteris, todėl šiuo atveju aktyvacijos energija mažesnė ir acilmigracija vyksta greičiau [129]. Duolitas yra anijoninė mainų derva, skatinanti acilmigraciją, todėl fermentai, imobilizuoti ant jos, gali atrodyti kaip nespecifiniai (pvz. Lipozyme RM IM imobilizuotas ant Duolito 568). Celitas, dažnai naudojamas fermentų imobilizacijai, taip pat katalizuoja acilmigraciją, tačiau jei jis prieš procedūrą plaunamas rūgštimi, ši savybė prarandama nes pašalinamas teigiamas paviršiaus krūvis. Labiausiai acilmigraciją skatina silikagelis, tačiau silikagelis su boro rūgštimi slopina acilmigraciją, nes boro rūgštis suformuoja kompleksą su laisvomis glicerolio hidroksilgrupėmis [130].

**Taikymas.** Norint lipazes naudoti regioselektyvioms reakcijoms ar regioselektyvumo tyrimams, verta naudoti nešiklį, neturintį paviršiaus krūvių, kuris būtų inertiškas acilgrupės migracijos atžvilgiu, pavyzdžiui polipropileną.

Tirpiklis taip pat turi neskatinti acilmigracijos (tinkami tirpikliai yra ketonai, eteriai ir toluenas), acilmigracija dar labiau slopinama pridėjus alkoholių į reakcijos mišinį, reakcijos temperatūra turėtų būti kiek įmanoma žemesnė [129].

Norint specifines lipazes naudoti kaip nespecifines, nešikliai ir acilmigraciją skatinantys reakcijos priedai kaip tik atveria daugiau galimybių. Biodyzelino sintezė – vienas iš tokių pavyzdžių. Lipozyme TL IM - imobilizuota *Thermomyces lanuginosus* lipazė, žinoma, kaip griežtai 1,3-specifinė, tačiau ją naudojant biodyzelino sintezės katalizei reakcijos išeiga dažniausiai pasiekama kur kas didesnė nei 66,7 % (tokia būtų teorinė didžiausia biodyzelino išeiga, jei būtų skeliamos tik 1- ir 3-TAG esterinės jungtys). Manoma, kad reakcijos proceso metu vyksta acilmigracija, ypač atsižvelgiant į tai, kad šio fermento imobilizacijai panaudotas silikagelis [64]. Iš tiesų, įvairių tyrimų metu naudojant anijonines jonų mainų dervas, silikagelį, ant poliuretano imobilizuotas ląsteles, buvo pagerinta fermentinės biodyzelino sintezės išeiga [64, 65, 131]. Tik Wang ir kt. tyrimų metu silikagelis, naudojamas kaip reakcijos priedas, turėjo neigiamą įtaką biodyzelino reakcijos išeigai (išeiga tik 2 %, palyginus su gryna lipaze ir kitais priedais gauta 82-90 %), autoriai svarsto, kad tai galėjo lemti silikagelio higroskopiškumas [65], tačiau tokia maža išeiga turėjo būti nulemta ne acilmigracijos, bet pačios katalizės slopinimo, kurį galėjo lemti naudotas silikagelio tipas (pavyzdžiui skirtas plonasluoksnei chromatografijai), jo sudėtyje galėjo būti ir kitų medžiagų. Taigi biodyzelino katalizės efektyvumą gali nulemti įvairūs reakcijos mišinio priedai, kurių poveikis tam tikromis sąlygomis gali būti neprognozuojamas, todėl būtina griežta reakcijos sąlygų kontrolė. Tai aktuali sritis, kurioje reikalingi detalesni tyrimai.

### **1.7 Lipazių panaudojimas pramonėje ir biokatalizei**

Organinėje sintezėje lipazės yra plačiausiai naudojama fermentų klasė [1], o pagal fermentų pardavimų dydį jos užima trečią vietą po proteazių ir karbohidrazių [30]. Komercinis lipazių panaudojimas - milijardus dolerių

skaičiuojantis verslas, apimantis daugelį sričių. Dažniausiai lipazės naudojamos riebalų ir aliejaus, maisto produktų perdirbimui, odos ir tekstilės apdirbimui, dedamos į skalbiklius, ploviklius, buitinės chemijos prekes, popieriaus gamybai, ypatingų cheminių junginių sintezei (angl. fine chemicals), vaistinių ir kosmetinių medžiagų gamybai, taip pat riebių atliekų bei poliuretano irimui pagreitinti [25]. Jau 1974-aisiais Seitz aprašė pagrindines lipazių taikymo sritis [132], kurių dauguma, beje, sutampa su šiandieninėmis, vis dėlto, dėl intensyvių tyrimų ir taikymo per keturis dešimtmečius panaudojimo būdų, reakcijų ir produktų įvairovė labai išsiplėtė.

Didžiausias biokatalizės naudojant lipazes privalumas – švelnios reakcijos sąlygos, labai grynų produktų sintezė ir/ar lengvesnis jų gryninimas [73]. Pramoninės biokatalizės poveikis aplinkai mažesnis, nes susidaro mažesni šalutinių produktų kiekiai, žemesnė reakcijos temperatūra, mažiau sunaudojama vandens [37]. Galimybės taikyti lipazes oleochemijos pramonėje yra didžiulės. Aliejų ir riebalų gamybos apimtys pasauliniu mastu siekia maždaug 60 mln. tonų per metus, iš jų žymi dalis (daugiau nei 2 mln. tonų per metus) sunaudojama daug energijos reikalaujančiuose procesuose, tokiuose kaip hidrolizė, glicerolizė ir alkoholizė (temperatūros siekia 240 – 260 °C, naudojami aukšti slėgiai). Tokių reakcijų produktai dažnai yra nestabilūs, o priemaišų ir skilimo produktų pašalinimui reikalingas perdistiliavimas. Nesociąšias RR turintys, aukštoje temperatūroje nestabilūs aliejai taipogi negali būti naudojami tokiuose procesuose be išankstinio hidrinimo. Energijos taupymas ir galimybė išvengti terminės degradacijos tikriausiai yra patraukliausios procesų savybės, keičiant dabartines chemines technologijas biologinėmis [30].

Nepaisant to, kad komerciniu būdu platinamų lipazių yra santykinai daug, jų taikymas pramonėje – ribotas. Tai lemia didelė kai kurių fermentų kaina, maža lipazių, gaminamų dideliais kiekiais, įvairovė bei prastos kai kurių biokatalizės procesų eksploatavimo savybės. Vis dėl to lipazės šiuo metu daugiausia naudojamos maisto, detergentų ir farmacijos pramonėse [26].

Parduodamų lipazių preparatų kaina labai priklauso nuo to, ar sudėtinga fermentą išskirti ir ar jau yra sukurti rekombinantiniai organizmai jo sintezei [58]. Autoriai teigia, kad dauguma fermentų, šiuo metu naudojamų organinėje sintezėje, gali būti gaminami dideliais mastais. Kai kurie jų yra pakankamai pigūs ir naudojami kaip skalbimo miltelių sudedamoji dalis.

1.5 lentelėje pateiktos kai kurios komerciniu būdu platinamos lipazės, jų šaltiniai ir taikymo pramonėje sritys.

1.5 lentelė. Kai kurios komerciniu būdu platinamos lipazės, jų šaltiniai ir taikymo pramonėje sritys [25].

Šaltinis	Taikymo sritis	Komercinis pavadinimas	Gaminanti bendrovė
<i>Humicola lanuginosa</i>	Detergentams	Lipolase TM	Novo Nordisk
<i>Candida cylindracea</i>	Maisto pramonėje	ChiroCLEC_CR Lipase AY Lipase MY, lipase OF-360 Chirazyme® L-3 Lipomod™ 34P-L034P	Atlas Biologics Amano Meito Sangyo Boehringer Mannheim Biocatalysts
<i>C. rugosa</i>	Organinėje sintezėje	Lipase AY „Amano“ 30 Resinase	Amano Novozymes
<i>R. miehei</i>	Maisto gamyboje	Palatase	Novozymes
<i>T. lanuginosus</i>	Detergentams	Lipolase®, Lipolase® Ultra, Lipo Prime™, Lipex®	Novozymes
<i>Aspergillus niger</i>	Maisto gamyboje	Lipase A „Amano“ 6 Lipolive AN	Amano Lyven
<i>Rhizopus oryzae</i>	Maisto gamyboje, aliejaus pramonėje	Lipase F-AP15 Lipomod™ 627P-L627P	Amano Biokatalizė
<i>Rhizopus niveus</i>	Aliejaus pramonėje	Newlase F	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Maisto gamyboje	Piccnate	Gist-Brocades Novo Nordisk
<i>Mucor javanicus</i>	Maisto gamyboje, aliejaus pramonėje	Lipase M „Amano“ 10	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Maisto gamyboje	Lipomod™ 338P-L338P	Biocatalysts
<i>Penicillium camemberti</i>	Maisto gamyboje, aliejaus pramonėje	Lipase G „Amano“ 50	Amano
<i>Penicillium sp.</i>	Maisto gamyboje	Lipomod™ 621P-L621	Biocatalysts
<i>Candida antarctica A/B</i>	Organinėje sintezėje	Chirazyme® L-5 SP526 Chirazyme® L-2 SP525 ar Novozym 435	Boehringer Mannheim Nova-nordisk
<i>Geotrichum candidum</i>	Aliejaus pramonėje	Chirazyme® L-8 SP524, Lipolase®	Boehringer Mannheim Nova-nordisk

Mikrobinės kilmės lipazės yra kur kas dažniau naudojamos nei augalinės ar gyvūninės lipazės. Mikroorganizmų atveju galima pasiekti didesnes fermentų išeigas bei genetiškai modifikuoti fermentą produkuojantį

mikroorganizmą, tokiu būdu gaunant pigią pageidaujamų savybių lipazę [73]. Mikrobinės lipazės gali katalizuoti didelę reakcijų įvairovę vandeninėje ir bevandenėje aplinkoje. Mokslininkus ir pramonininkus ypatingai domina chemo-, regio- ir enantio-spezifinis (savitas) fermentų elgesys. Daug bakterinių, grybinių ir kelios gyvūninės bei augalinės lipazės išgrynintos iki homogeninio lygio [80].

Praktiškai visos pramoniniu būdu sintetintos lipazės yra užląstelinės – sekretuojamos (išskiriamos) iš ląstelių į išorę – pašalinus biomasę jos lieka augimo terpėje, iš kurios koncentruojamos garinant, filtruojant per membranas ar kristalizuojant, priklausomai nuo numatytos paskirties. Jei reikalingi grynai fermentai (pvz. tyrimams), jie dažniausiai gryninami įvairiais chromatografijos būdais. [34]

Tikimasi, kad pasiekimai vertingų bei brangių junginių biokatalizės srityje padės biokatalizei judėti koja kojon su organine sinteze (chemo-fermentinis sintetinis kelias), o šio darbo vaisių galime tikėtis dvidešimt pirmame amžiuje [133].

Lipazių panaudojimo spektras organinės sintezės reakcijoms katalizuoti literatūroje yra bene plačiausiai ir išsamiausiai išnagrinėtas, todėl vertas atskiro aptarimo ir šiame darbe. *In situ* lipazių taikymas maisto, popieriaus, odos pramonėje, medicinoje (pvz. virškinimui, biosensoriams) bei nuotekų valymui detaliai apžvelgtas Hasan ir kt. publikacijoje [30], o fosfolipidų konversijos - Adlercreutz apžvalgoje [21]. Biodegalų sintezė aprašyta atskirai 1.8 skyriuje.

### **1.7.1 Triacilglicerolių fermentinė sintezė**

Lipazės yra puikūs įrankiai TAG sintezei ar modifikacijoms organinėje terpėje [134]. Jos pasižymi įvairiais specifiškumo tipais triacilglicerolių substratų atžvilgiu. Ypatingai svarbus regiospecifiškumas, nes didelė dalis lipazių specifiškai atskelia riebalų rūgštis, esančias glicerolio karkaso *sn-1* ir *sn-3* padėtyse. Reikia turėti omenyje ir specifiškumą riebalų rūgšties grandinės ilgiui bei nesotumo laipsniui, tačiau TAG gamybai ši savybė iki šiol

neišnaudojama. Stereospecifiškumas ribotai buvo panaudotas chiralinių TAG sintezei [135].

*sn*-1,3-Specifinės lipazės puikiai pasitarnauja *sn*-1 ir *sn*-3 padėtyse turinčių skirtingas nei *sn*-2 padėtyje riebalų rūgštis TAG sintezei [21]. Tai – vadinamieji struktūriniai TAG. Jei jie turi vidutinio ilgio riebalų rūgštis *sn*-1 ir *sn*-3 padėtyse ir nesočiąją ilgą riebalų rūgštį *sn*-2 padėtyje, jie gali būti naudojami kaip vidutinio grandinės ilgio trigliceridų pakaitalas (koncentruota kalorijų dozė kasos nepakankamumą turintiems ligoniams) [136]. Struktūrinių trigliceridų sintezė svarbi kokybiškų, kuo panašesnių į motinos pieną, kūdikių mišinių riebalų sintezei [137].

Regiospecifiškumu nepasižyminčios lipazės jau naudojamos triacilglicerolių riebalų rūgščių pakeitimo reakcijose. Svarbiausias pavyzdys – margarino riebalų interesterinimas (riebalų rūgščių mainai tarp skirtingų triacilglicerolio molekulių). Margarinas ir riebalai kepiniams paprastai sudaryti iš dviejų arba daugiau sudėtinių dalių, kurių viena yra aukštos lydymosi temperatūros, kita – žemos. Norint gauti homogenišką produktą, reikalingi riebalų rūgščių mainai (randomizacija) tarp triacilglicerolio molekulių. Cheminiu būdu tai atliekama naudojant katalizatorių natrio metilatą. Fermentinė reakcija yra konkurencinga, nes sukurtas pigus fermento imobilizacijos būdas, gaunama didesnė išeiga, mažiau atliekų ir pigesnis produktų gryninimas [21]. 2001 bendradarbiaujant su Novozymes, Karlshamns (dabar AAK) pirmieji Švedijoje pradėjo naudoti imobilizuotą fermentą Lipozyme® TL IM margarino gamybai. Pirmasis pramoninis reaktorius talpino 400 kg imobilizuotos lipazės. 2002 Archer Daniels Midland (ADM) įrengė pirmąjį komercinį fermentinį reaktorių JAV, jie pirmieji ir pradėjo gaminti riebalus kepiniams bei margariną be *trans*- riebalų rūgščių [37].

### 1.7.2 Esterių fermentinė sintezė

Didžioji dalis reakcijų, vykstančių organinėje aplinkoje ir katalizuojamų lipazių pagalba, yra esterių sintezė. Iš tiesų, taip galima susintetinti didelę

esterių įvairovę. Nors įprastai esteriai sintetinami cheminės katalizės būdu, fermentinė katalizė turi savų privalumų. Vienas iš pavyzdžių, keliančių didelį susidomėjimą - tai skonių ir kvapų esterių, naudojamų maisto pramonėje, sintezė. Fermentiniu keliu susintetinti esteriai gali būti žymimi kaip „natūralūs“, skirtingai nuo susintetintų cheminiu būdu. Kvapų ir skonių esteriai tradiciškai sudaryti iš acto, sviesto ar kaprino rūgščių ir etanolio, butanolio, izopentanolio ar sudėtingesnių alkoholių, pvz. geraniolio. Sintetinant esterius, reikia atkreipti dėmesį, kad trumpos riebalų rūgštys yra sąlyginai polinės ir fermento mikroaplinkoje gali disocijuoti, taip sumažindamos pH. Dėl to gali sumažėti fermento aktyvumas. Praktiškai ši problema sprendžiama acildonorais naudojant šių rūgščių esterius [21].

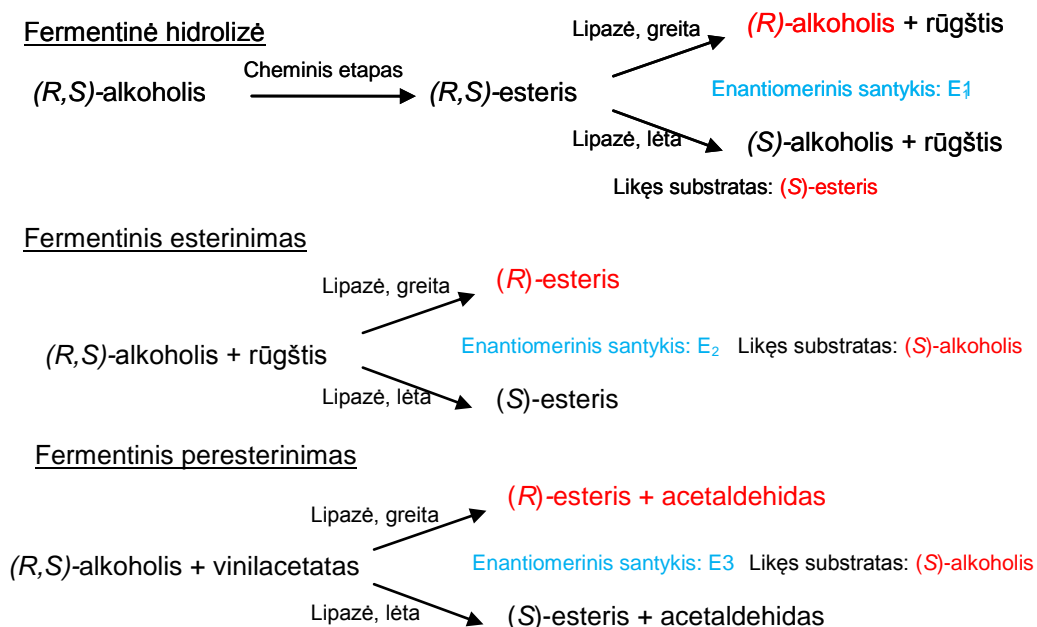
Ilgų riebalų rūgščių ir ilgų alkoholių esteriai vadinami vaškais. Fermentinis būdas naudojamas vaškam, skirtiems kūno priežiūros priemonėms (kosmetikai), sintetinti. Jei reakcijos metu susidarantis vanduo efektyviai šalinamas iš reakcijos mišinio (pvz. pučiant sausą orą per reaktorių), galima pasiekti beveik pilną konversiją iš ekvimoliarinių reaguojančių medžiagų mišinių [21].

### **1.7.3 Enantiomerų atskyrimas**

Kaip jau minėta, lipazės – plačiausiai organinėje sintezėje naudojama fermentų klasė. Jos ypatingai vertingos kinetinio raceminių junginių atskyrimo reakcijose. Tai lėmė didelis komercinių fermentų preparatų pasirinkimas, platus specifiškumas ir, lyginant su kitais fermentais, santykinai geras stabilumas organinėje aplinkoje [1]. Daugelis farmacinių kompanijų naudoja lipazes optiškai aktyvių tarpinių junginių sintezei vidutinio stambumo (kilogramų) mastu [30]. Raceminio mišinio kinetinis atskyrimas – tai metodas, kai lipazė paverčia vieną iš enantiomerų produktu, tuomet jis gali būti lengvai atskirtas nuo nesureagavusio izomero. Idealiu atveju fermentas produktu paverčia tik vieną iš enantiomerų, tačiau realybėje dažniausiai reaguoja ir kitas enantiomeras, tik lėčiau. Kinetinio atskyrimo sėkmę lemia lipazės specifiškumas, kuris aprašomas enantiomeriniu santykiu (ES), apibrėžiamu



kaip dviejų enantiomerų fermentinės konversijos specifiškumo konstantų santykis [21]. Grįžtamoji reakcija gali sumažinti enantiomero perteklių (enantiomeric excess) [138]. Kita vertus, ta pati lipazė gali būti panaudota trijų tipų reakcijoms: hidrolizei, esterinimui, peresterinimui katalizuoti. Tai yra didelis privalumas, nes padidėja tikimybė rasti praktiškai naudingą reakciją, pasižyminčią pakankamai dideliu ES (galimybė rinktis iš trijų tipų reakcijų, kurių ES skirtingi) (1.11 pav.). Be to, reakcijos grįžtamumo problemos galima išvengti acildonorais naudojant vinilo ar izopropenilo esterius, nes susidarantys šalutiniai reakcijos produktai - nestabilūs alkoholiai, taigi reakcija tampa praktiškai negrįžtama [21].



1.11 pav. Lipazių katalizuojamos reakcijos dviejų raceminio alkoholio enantiomerų atskyrimui. Du pagrindiniai produktai kiekvienu atveju pažymėti raudonai (reakcijos produktas ir likęs substratas). Visais atvejais lipazė konvertuoja substrato *R*-enantiomerą greičiau, nei *S*-enantiomerą, tačiau enantiomerinis santykis (E) kiekvienu atveju gali būti skirtingas [21].

Chiraliskumas lemia daugelio vaistų veiksmingumą. Kelios kompanijos pasaulyje daugiakilograminiu mastu gamina optiškai grynus junginius, iš kurių vėliau sintetinami grynai herbicidai arba nesteroidiniai priešuždegiminiai vaistai (naproxenas, ibuprofenas). *C. antarctica* lipazė (Novozyme® 435) naudojama kinetiniam flurbiprofeno atskyrimui enantioselektyviai esterinant alkoholiais. Baclofen'o raceminio mišinio atskyrimui naudojama *C. cylindracea* lipazė

[30]. BASF pramoniniu būdu sintetina chiralinius aminus, katalizuojant imobilizuotai CALB ar *Burkholderia* lipazei. RML taip pat naudojama pramonėje [21].

#### 1.7.4 Praturtinimas riebalų rūgštimis

Analogiškai kinetiniam enantiomerų atskyrimui fermentai gali būti naudojami kitų izomerų ar giminingų medžiagų praturtinimui. Lipazių katalizuojamas praturtinimas riebalų rūgštimis remiasi tuo, kad lipazė, būdama specifiška tam tikram RR grandinės ilgiui, dvigubų jungčiui kiekiui ir/ar pozicijai, taip pat kitoms savybėms (šakotumui, hidroksilinimui), greičiau atskelia šias RR nuo glicerolio karkaso.

Dėl teigiamo poveikio sveikatai, norint gauti specialų maisto papildą, labiausiai domimasi jūrinių gyvūnų aliejuje randamų ilgagrandžių  $\omega$ -3 (eikozapentano ir dokozaheksano) RR praturtinimu. Vykdam kartotinę lašišų aliejaus hidrolizę, ilgagrandžių omega-3 riebalų rūgščių kiekį galima padidinti nuo 16 iki 51 %. [21].

#### 1.7.5 Monoacilglicerolių ir diacilglicerolių fermentinė sintezė

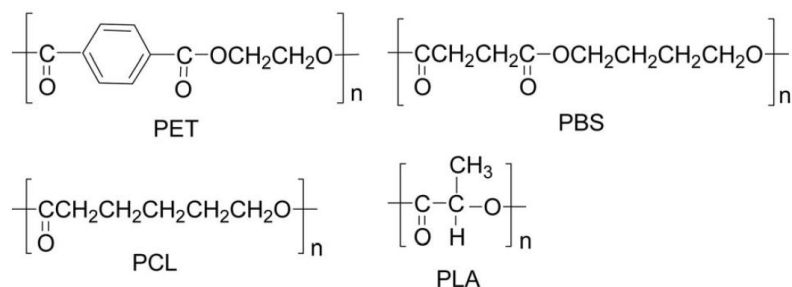
Nesotūs MAG naudojami kaip pradinės medžiagos kitų struktūrinių medžiagų sintezei. Brangius 2- MAG galima gauti vykdant TAG fermentinę alkoholizę, kuri ypač naudinga kai sintetinami aukštai temperatūrai jautrūs MAG [101, 136]. Viena iš alkoholizės atmainų – glicerolizė, tačiau jos pagrindinis trūkumas yra tas, kad reakcijos sistema susideda iš trijų fazių: hidrofobinės aliejaus fazės, hidrofilinės glicerolio fazės ir netirpios imobilizuoto fermento fazės. Fermentai turi hidrofilinių amino rūgščių, todėl fermentas gali aplipti glicerolio molekulėmis ir apsunkinti aliejaus molekulių prieinamumą [139]. Dėl šių priežasčių fermentinė glicerolizė pramonėje nepraktiška [101].

1,3-DAG gali būti sintetinami cheminės glicerolizės būdu iš riebalų naudojant šarminius katalizatorius ir temperatūras, viršijančias 200 °C [140], tačiau išeiga ir grynumas menki, todėl pramoninei sintezei nelabai tinkami

[141]. 1,3-DAG galima gauti esterinant riebalų rūgštis be tirpiklio, naudojant 1,3-regiospecifines lipazes ir šalinant iš reakcijos mišinio vandenį. Sistemoje be tirpiklio pasiekta 84,6 % išeiga ir 96 % grynumas naudojant oktano rūgštį [142].

### 1.7.6 Poliesterių sintezė

Poliesteriai praktiniu atžvilgiu yra labai svarbios ir plačiai naudojamos medžiagos, tokios kaip polietilentereftalatas (PET), polibutilensukcinatas (PBS), poli-ε-kaprolaktonas (PCL) ir polipieno rūgštis (PLA) (formulės pavaizduotos 1.12 pav.). Pramonėje pirmieji du gaminami polikondensacijos, kiti – žiedo atidarymo polimerizacijos būdais [143].



1.12 pav. Praktiškai naudojamų poliesterių pavyzdžiai [143]

Žiedo atidarymo polimerizacija vyksta polimerizuojant ciklinius monomerus (tokius kaip cikliniai esteriai – laktonai), o kondensacijos polimerizacija vyksta reaguojant karboksi rūgšties ar esterio grupei su alkoholio grupe. Lipazių katalizuojama polimerizacija pasižymi ypatingu chemo-, regio- ir enantioselektyvumu, todėl turi įvairių pranašumų prieš cheminę polimerizaciją, norint gauti tam tikrų savybių produktus [143].

Polihidroksialkanoatai, biodegraduojami polimerai, *in vivo* (fermentatoriuje) buvo susintetinti XX a devintajame dešimtmetyje [144]. *In vitro* sintezė naudojant lipazę pirmą kartą aprašyta to paties dešimtmečio viduryje, tačiau realiai tos krypties tyrimai prasidėjo 1993 m., kai žiedo atidarymo polimerizacija buvo nepriklausomai atrasta dviejų grupių [145, 146]. Vėliau fermentinės polimerizacijos būdais gauti polisacharidai, poliesteriai,

poliaromatiniai junginiai, kurie gali būti modifikuojami įvairiomis funkcinėmis grupėmis tame pačiame reakcijos mišinyje [147]. Poliesterių sintezės tyrimams naudojamos *C. cylindracea*, *P. fluorescens*, *A. niger*, *C. rugosa*, *P. roqueforti*, *P. cepacia*, *R. japonicus*, *R. miehei*, *C. antarctica*, *Y. lipolytica*, kiaulių kasos lipazės. Fermentinė polimerizacija atitinka žaliosios polimerų chemijos aspektus, tačiau nepaisant visų galimybių ir privalumų fermentinė polimerų sintezė pramonėje vis dar beveik nenaudojama [143].

### 1.7.7 Lipofilizacija

Lipazės gali būti naudojamos lipofilizacijos reakcijoms, į hidrofilinį junginį, tokį kaip sacharidai, aminorūgštys, baltymai ar fenoliniai junginiai, įskiepijant (angl. grafting) lipofilinę grupę ir taip padidinant junginių tirpumą hidrofobinėje terpėje. Hidroksi- arba karboksi- grupes turintys hidrofiliniai junginiai gali būti paverčiami ilgagrاندžių karboksirūgščių ar alkoholių esteriais. Dauguma šių junginių yra gana jautrūs reakcijos sąlygoms, todėl katalizuoti reakcijas lipazėmis yra paranku, nes jos vyksta švelniomis sąlygomis. Didžiausia kliūtis yra ta, kad substratai labai skiriasi savo poliškumu ir giminingumu tirpikliui [21, 102]. Naudojant lipazes lipofilizuoti galima ne vien substratus, turinčius alkoholio ar karboksirūgšties grupes, bet ir amino rūgštis. Nors amino rūgštys bei jų dariniai ir nėra natūralūs lipazių substratai, tačiau publikacijose aprašoma fermentinė *n*-acil-aminorūgščių (dar vadinamų lipoaminorūgščių) sintezė bei įdomios jų paviršiaus aktyvumo savybės taip pat biologinis (antimikrobinis) aktyvumas [148]. Viena vertus, riebalų rūgštys gali būti acildonorais šoninių hidroksi-, amino- ar tiolinių grupių lipofilizavimui, kita vertus, naudojant ilgagrандžius alkoholius ar aminus galima lipofilizuoti šonines karboksigrupes. Analogiškos modifikacijos gali būti atliktos baltymams [102].

Lipazės gali būti panaudotos netgi tokių sudėtingų junginių, kaip polifenoliai, lipofilizacijai [149]. Flavonoidai, randami daugelyje augalų rūšių, įdomūs savo stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, tačiau dėl savo hidrofiliškumo juos sunku panaudoti aliejų ir riebalų apsaugai nuo oksidacijos.

Lipazių pagalba modifikuojant flavonoidus galima padidinti jų lipofiliškumą. Rutinas ir naringinas buvo modifikuoti C8-C12 riebalų rūgštimis naudojant CALB, konversija siekė 50 – 60 %, aptiktas tik flavonoido monoesteris, todėl manoma, kad šis esterinimas regioselektyvus [150, 151].

Didžioji dalis reakcijų, kuriose naudojami neįprastiniai lipazių substratai, geriausiai katalizuojamos CALB.

### **1.7.8 Angliavandenių modifikacijos**

Angliavandenių esteriai yra patrauklios paviršiaus aktyviosios medžiagos (PAM). Jie gali būti sintetinami cheminiu būdu, tačiau naudojant lipazes įmanomas regioselektyvus acilinimas švelniomis sąlygomis [21]. Fermentinis polisacharidų acilinimas – sudėtinga užduotis dėl labai skirtingų reaguojančių medžiagų tirpumo savybių. Dėl didėjančio susidomėjimo iš atsinaujinančių žaliavų pagamintais produktais, daug pastangų skiriama polisacharidų, esančių gamtoje (ypatingai krakmolo) acilinimui [21, 152].

## **1.8 Biodyzelino sintezė**

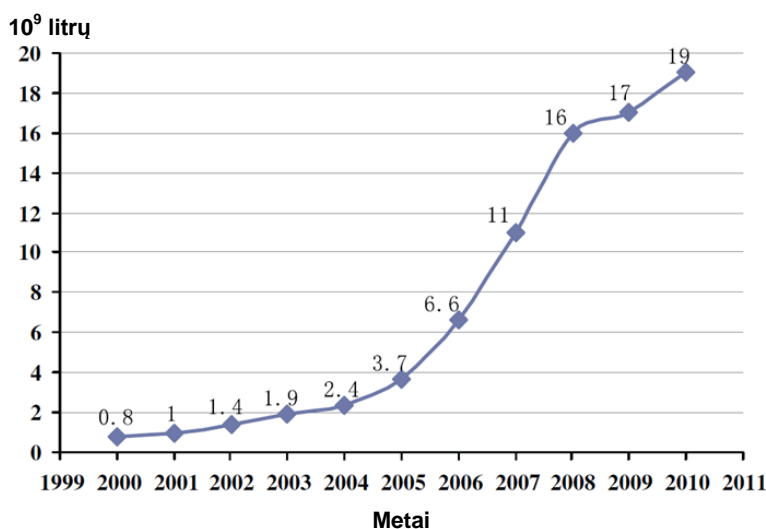
### **1.8.1 Biodyzelino sąvoka, reikšmė, susiję reglamentai**

Pasaulyje sunaudojamos energijos kiekis nuolatos didėja iš esmės dėl dviejų priežasčių: 1) gyvenimo būdo pokyčių ir 2) ryškaus žmonių populiacijos augimo. Dvidešimt pirmame amžiuje ypač išryškėjo neigiamas šiltnamio dujų poveikis aplinkai bei naftos atsargų mažėjimas. Šiuo metu naudojamos šios alternatyvus kuro rūšys – oksigenatai (alkoholis, eteris ir kt.), augaliniai aliejai ir jų esteriai, dujinis kuras (vandenilis, suskystintos naftos dujos), dujiniai angliavandeniliai, paversti skystais (GTL) ir akmens anglies dariniai [153].

Europos šalys pripažįsta alternatyvaus kuro poreikį, todėl išleistos direktyvos, skirtos skatinti biokuro ir kito atsinaujinančio kuro naudojimą transportui (2003/30/EC, vėliau 2009/28/EC). Ja remiantis, 2020 m. 20 % Europos sunaudojamos energijos turės būti gaunama iš atsinaujinančių šaltinių [73]. Privaloma sunaudojamos energijos dalis, kuri turi būti gaunama iš

atsinaujinančių išteklių, kiekvienai Europos sąjungos šaliai yra skirtinga, priklausomai nuo jos gamtinių išteklių, dabartinio atsinaujinančių išteklių naudojimo laipsnio ir kitų veiksnių, ir svyruoja nuo 10 % (Malta) iki 49 % (Švedija). Lietuvai ši dalis 2020 metais turės siekti 23 % [154, 155]. Atitinkami nutarimai priimti Lietuvos respublikos atsinaujinančių išteklių energetikos įstatyme [156].

Biodyzelinas – viena iš alternatyvaus kuro rūšių. Tai augalinės ar gyvūninės kilmės riebalų rūgščių alkilo (metilo, etilo, propilo ar kt.) esterių mišinys. Tai dažniausiai naudojamas biologinės kilmės kuras [157]. 2005 pasaulyje pagaminamo biodyzelino kiekis buvo lygus 2,92 mln tonų per metus (per 5 m. nuo 2000 šis kiekis padidėjo 3 kartus), iš kurio 87 % buvo gaunami Europos sąjungoje. [158]. Pasaulio atsinaujinančių išteklių ataskaitoje užregistruotas 2010 m. pagaminamo biodyzelino kiekis jau siekė 19 milijardų litrų per metus (1.13 pav.) [159]. Naujuose ES planuose siūloma nedidinti biodyzelino kiekio iš maistui tinkamo ir vertingus žemės ūkio plotus užimančių augalų aliejaus dėl didesnio CO<sub>2</sub> pėdsako, atsirandančio dėl žemės ūkio naudmenų perskirstymo ir miško plotų išskirtimo auginti aliejingoms kultūroms (pasiūlymas ES direktyvai reglamentuoti 5 % šios kilmės biodegalų degaluose) [160], atliekinio aliejaus panaudojimas skatinamas, o jo gamybai ypač tinkamos lipazės.



1.13 pav. Pasaulinė biodyzelino gamyba 2000 – 2010 m. [159].

Biodyzelinas yra gera kuro atmana ne tik todėl, kad gaminamas iš atsinaujinančių šalinių, bet ir todėl, kad jam degant nesusidaro sieros oksido, be to, lyginant su įprastiniu dyzelinu, mažesnė kitų kenksmingų medžiagų emisija: CO vidutiniškai 48 %, kietų dalelių koncentracija apie 47 %, angliavandenių (dėl kurių susidaro smogas) - 67 %, kancerogeninį poveikį turinčių policiklinių aromatinių angliavandenilių - 75–85 %. Azoto oksidų (NO<sub>x</sub>) emisija sumažėja arba padidėja, priklausomai nuo variklio tipo ir sąlygų [30, 161]. Europoje biodyzelinas turi atitikti kokybės reikalavimus, aprašytus standarte EN 14214 [162].

### 1.8.2 Žaliavos, naudojamos biodyzelino gamybai

Biodyzelinas gali būti gaminamas iš įvairių trigliceridų, gaunamų iš skirtingų šaltinių. Juos galima suskirstyti į tris pagrindines grupes:

- 1) augaliniai aliejai, pavyzdžiui, saulėgrąžų, sojų, rapsų, palmių, braivėlių (*Jatropha*), vilnamedžio ir kt.;
- 2) gyvuliniai riebalai, pavyzdžiui, taukai, lajus;
- 3) kepimo aliejaus ir pramoninio aliejaus atliekos [73].

Riebalai ir aliejus gali būti klasifikuojami pagal savo fizikines (tankis, klampumas, lydymosi temperatūra, lūžio rodiklis) ar chemines (rūgštingumas, jodo vertė, peroksido vertė, saponifikacijos vertė) savybes, nuo jų vėliau priklauso biodyzelino kokybė. Pavyzdžiui, jodo vertė (skaičius) parodo aliejaus nesotumo laipsnį. Bendru atveju biodyzelinas, pagamintas iš aliejaus, turinčio didelę dalį nesočiųjų RR, yra mažiau klampus, žemesnėje temperatūroje drumsčiasi ir užšąla, dėl to jis tinkamesnis naudoti šalto klimato sąlygomis. Tačiau toks kuras lengviau oksiduojasi, turi mažesnę cetano skaičių (dėl reakcijos efektyvumo variklyje) ir mažesnę šilumingumą [163].

Teigiama, kad gyvulinių riebalų sudėtis dėl dominuojančių sočiųjų RR nėra tinkama biodyzelino sintezei, į tokį biodyzeliną reikėtų maišyti nuo užšalimo saugančius junginius [73]. Augaliniai riebalai kur kas labiau tinka biodyzelino sintezei, o kuri augalo kultūra bus pasirinkta, priklauso nuo to, kas

auga ir auginama tam tikroje vietovėje. Pavyzdžiui, JAV daugiausiai naudojamas sojų aliejus, o Europoje – rapsų ir saulėgrąžų aliejus, Azijoje naudojamas kokosų ir palmių aliejus [73]. Sojų ir saulėgrąžų aliejuje dominuoja linolo rūgštis (C18:2), o rapsų ir palmių aliejuje – oleino rūgštis (C16:1) (1.6 lentelė).

Kokosų ir palmių branduolių aliejaus sudėtis smarkiai skiriasi nuo kitų augalinių aliejų, nes didžiąją dalį sudaro sočiosios vidutinio grandinės ilgio RR, dominuoja laurino rūgštis (C12). Kai kurie autoriai teigia, kad nors gyvulinių riebalų RR sudėtis šiek tiek ir skiriasi nuo maistinio ir nemaistinio augalinio aliejaus RR, biodyzelino savybėms tai neturi labai didelės įtakos. Pavyzdžiui, tiek lajuje, tiek kiaulių taukuose dominuoja nesočioji oleino rūgštis, žinoma, gana didelę dalį (40-50 %) sudaro sočiosios palmitino ir stearino RR (1.6 lentelė). Tačiau gyvuliniai riebalai turi ir kitų trūkumų: juose yra gana daug laisvų RR ir vandens, tai sukelia sunkumų norint juos naudoti biodyzelino sintezei cheminiu būdu [164–166].

Aliejaus ir riebalų RR sudėtis ir išeigos iš hektaro pateikta 1.6 lentelėje.

Lyginant aliejaus kainas, pigiausi – kokosų ir palmių aliejai (atitinkamai 0,89 ir 0,82 USD/kg), palyginimui sojų ir saulėgrąžų aliejaus kaina – atitinkamai 1,14 ir 1,52 USD/kg [164].

Nors maistinis aliejus ir yra tinkamas biodyzelino sintezei, jo pertekliaus nėra, be to, kaina pakankamai didelė. Siūlomas alternatyvus sprendimas - naudoti nemaistinius aliejus (augaliniai aliejai, kurie dėl didelio kiek laisvų RR ar toksiškų junginių nenaudojami maistui), kuriuos teikiančios kultūros gali augti itin prastame dirvožemyje [73], tačiau šios kultūros produktyvumu dažniausiai nusileidžia tradicinėms maistinėms kultūroms, atrinktoms per daugelį metų selekcijos būdu [164]. Kitas susidomėjimą sukėlęs sprendimo būdas – atliekų aliejaus panaudojimas biodyzelino sintezei.





Tai - kepiniai ar viriniai panaudotas aliejus (tačiau jis turi daug nesočiųjų RR ir drėgmės, kurie trukdo tradiciniam biodyzelino gamybos procesui) bei pramoninės atliekos: aktyvuotas dumblas, odos pramonės atliekos, žuvų taukų atliekos ir kt; tačiau tokio aliejaus kiekiai patenkintų tik dalį žaliavų poreikio [164]. Neseniai, kaip daug žadantis pigus riebalų išteklius biodyzelino sintezei, pradėti tyrinėti mikrodumbliai, kurie anglies šaltiniu gali naudoti anglies dioksidą o energijos šaltiniu - saulės šviesą. Miksoautotrofinės kultūros gali naudoti papildomus organinius anglies šaltinius [168]. Tačiau kol kas šio aliejaus gamybos kaina yra ir dar kurį laiką tikriausiai bus kliūtis jo panaudojimui. Pagrindinė priežastis – sąlygos, kuriomis aliejaus kiekis ląstelėje yra didelis, kaip tyčia slopina dumblių augimą (žema temperatūra, mažas šviesos intensyvumas, azoto trūkumas). Šiuo metu pakankamai sunku gauti dumblių biomase, turinčią 20 % aliejaus pigiau, nei už 1€/kg, naujų reaktorių pagalba dumblių aliejaus kainos yra šiek tiek mažesnės nei 5 €/kg [163]. Labiausiai kultivavimui tinkami lengvai auginami, didelį aliejaus kiekį turintys mikrodumbliai, pvz. *Chlorophyta*, *Bacillariophyceae*, ypač *Chlorella* [168].

### **1.8.3 Įprastinės (cheminės) ir fermentinės biodyzelino sintezės palyginimas**

Įprastinis biodyzelino sintezės būdas – triacilglicerolių peresterinimas trumpos grandinės alkoholiais, dažniausiai metanoliu, esant rūgštiniam ar šarminiam katalizatoriui. Šiuo metu dėl greitos ir pigios reakcijos praktiškai 100 % biodyzelino gaminama cheminiu būdu, naudojant šarminius katalizatorius [21, 163]. Įprastinė biodyzelino gamykla naudoja metanolį, aliejų, vandenį/NaOH ir H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ir pagamina 24 t/h 99,4 % grynumo RR metilo esterių, kurie gryninami distiliuojant. Šalutinis reakcijos produktas – glicerolis, - ekstrahuojamas vandeniu. Reakcija vyksta esant 60 °C, metanolio/aliejaus molinis santykis yra 6.14:1 [169].

Šiuo metu siekiama biodegalų gamybai panaudoti kuo daugiau atsinaujinančių žaliavų – biožaliavų. Įprastinis biodyzelinas gaminamas iš rapsų ar kito augalinio aliejaus jį peresterinant metanoliu, gaunamu iš gamtinių

dujų. Todėl įprastinio biodyzelino žaliavų sudėtyje ir galutiniame produkte apie 11 % sudaro mineraliniai ištekliai. Siekiant biodyzeliną gauti iš visiškai atsinaujinančių žaliavų, siūloma peresterinimui naudojamą metanolį pakeisti etanolium, paprastai gaminamu iš grūdų. Dar labiau tausojantys aplinką degalai gali būti gaunami peresterinimo procese naudojamus cheminius katalizatorius pakeičiant fermentiniais preparatais. Tai leidžia gauti grynesnį produktą mažesnėmis energijos sąnaudomis. Priešingai nei šarminės katalizės atveju, fermentinės reakcijos metu nesusidaro muilai, kurie pasižymi geromis emulsinimo savybėmis, ir apsunkina glicerolio atskyrimą nuo RR esterių, taigi fermentinės katalizės galutinis produktas – glicerolis – nuo riebalų rūgščių esterių atskiriamas lengviau [73]. Be to, aliejai, turintys daug laisvų RR gali būti naudojami iš karto, laisvas RR paverčiant į esterius. Tuo tarpu šarmais katalizuojamame procese, norint išvengti muilų susidarymo, reikalingas išankstinis tokio aliejaus apdorojimas [73], t.y. reikalingas dviejų pakopų cheminis procesas – pirmame etape naudojama rūgštinė katalizė, antrame – šarminė [163]. Aliejai, kurių sudėtyje daug vandens, taip pat sukelia problemų standartinei katalizei, nes vyksta hidrolizė ir formuojasi laisvos RR [21]. Dar vienas fermentinės katalizės privalumas – išvengiama šarminių ir druskingų atliekų, kurias reikia valyti.

Pagrindiniai pramoninio lipazių taikymo biodyzelino sintezei trūkumai – lipazių kaina (ji sudaro daugiau nei 90 % RR esterių gamybos kaštų), palyginus mažas reakcijos greitis [163] ir pakankamai prastas fermentų stabilumas esant metanolio pertekliui (lipazės inaktyvuojamos), nes įprastiniu atveju dėl mažo metanolio tirpumo aliejuje, reakcijos mišinyje susidaro dvi fazės. Šią problemą iš dalies išsprendžia laipsniškas metanolio įvedimas į reakcijos mišinį [73].

Apžvelgus šešis lipazių produktyvumo biodyzelino sintezėje tyrimus (kg biodyzelino/kg fermento) apskaičiuota, kad priimtina fermento kaina būtų 12-185 USD/kg (priklausomai nuo produktyvumo), t.y. vienam kilogramui biodyzelino priimtina fermentinio katalizatoriaus kaina būtų 0,025 USD [170].

Visgi, nepaisant iškylančių sunkumų, fermentinės technologijos pamažu žengia į pramonę: 2008 m Kinijoje jau veikė bandomasis reaktorius, gaminantis 20 000 t biodyzelino/metus [171], 2012 pradėjo veikti pirmasis fermentinis biodyzelino reaktorius JAV: Piedmont biofuels pasiekė 0,04 USD/l fermentinio katalizatoriaus kainą, o biodyzeliną pardavinėja už 1,11 USD/l [172].

#### 1.8.4 Fermentinė biodyzelino sintezė

##### 1.8.4.1 Reakcijos išeiga ir dažniausiai naudojami fermentai

Tyrimų apžvalgose pateikta daug duomenų apie fermentus, naudojamus biodyzelino sintezės reakcijoms įvairiomis sąlygomis ir reakcijų išeigą arba peresterinimo laipsnį (beje, šie terminai dažnai painiojami). Deja, duomenys retai kada būna tiek susisteminti ir išsamūs, kad leistų daryti vienareikšmiškas išvadas. Tyrimų rezultatai priklauso tiek nuo reakcijos sąlygų (temperatūros, maišymo greičio, fermento kiekio ir kt.), tiek nuo analizės metodo, kurie apžvalgose plačiau neanalizuojami.

Pavyzdžiui, sintetinant biodyzeliną iš įvairių aliejų, reakcijai nenaudojant tirpiklio ir naudojant Novozyme 435 fermentinį preparatą, bei metanolį skirtingi autoriai pateikia išeigas nuo 3 % iki beveik 100 % (1.7 lentelė). Populiariausi fermentai: Novozym-435 (imobilizuota CALB), Lipozyme IM (t.y. Lipozyme RM IM, imobilizuota RML), Lipozyme TL IM (imobilizuota TLL).

1.7 lentelė. Fermentinės biodyzelino sintezės peresterinimo būdu tyrimų pavyzdžiai

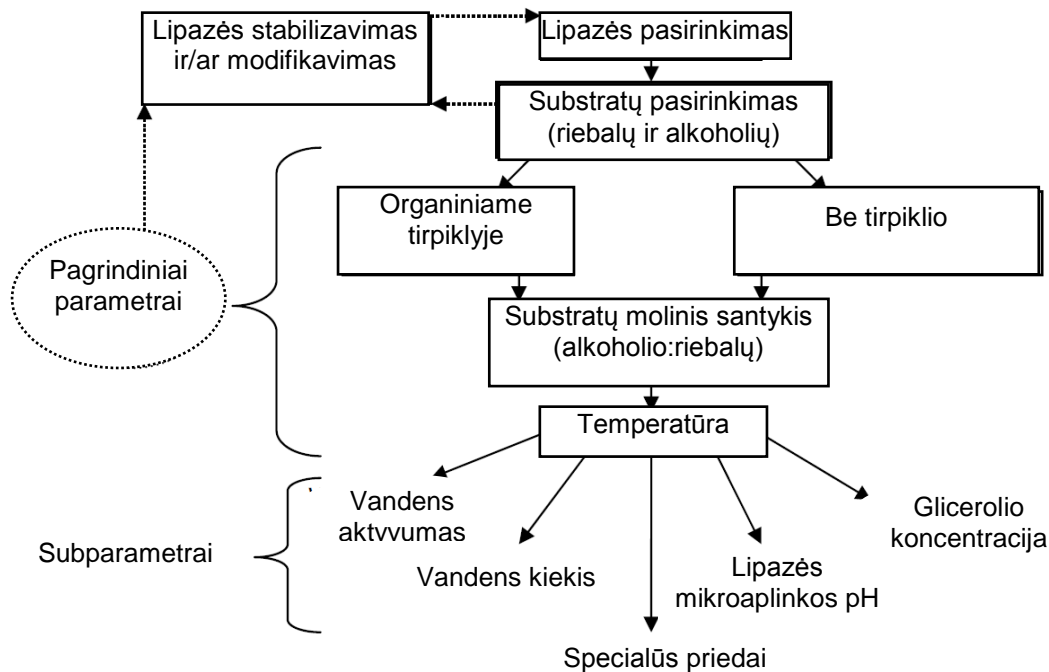
Aliejus	Fermentai	Acilakceptorius	Tirpiklis	Išeiga, %
Saulėgražų	Novozym-435	Metanolis	-	3
		Metanolis	Petrolio eteris	79
		Etanolis	-	82
Lajus	Lipozyme IM-60	Pirminiai alkoholiai	Heksanas	94,8-98,5
Sojos pupelių	Novozym	Antriniai alkoholiai	Heksanas	61,2-83,8
Rapsų	Lipozyme IM	Metanolis	-	19,4
	Lipozyme IM	Etanolis	-	65,5
Sojos	<i>Rhizopus oryzae</i> lipazė	Metanolis	- vanduo 4-30 %	80-90
Palmių	Lipazė PS-30	Metanolis	-	15
		Etanolis	-	72

Sojų	Novozym-435 preinkubuotas etiloleate	Metanolis	-	97
Sojų (negrynas)	<i>CALB</i>	Metanolis	-	93,8
Sojų	Novozym-435	Metilo acetatas	-	92
Trioleinas	Įvairios komercinės lipazės	Linijiniai ir šakoti alkoholiai	-	Beveik 100
Sojų	Lipazė-PS (imobilizuota)	Metanolis	-	67
		Etanolis	-	65
Augalų aliejai	<i>Candida sp.</i> lipazė (imobilizuota)	Metanolis	-	96-93
Kepimo aliejai				92
Rapsų	Lipozime TL IM	Metanolis	<i>t</i> -butanolis	95
	Novozym - 435	Metanolis	<i>t</i> -butanolis	95
Jatropha saulėgražų	Novozym - 435	2-propanolis	Heksanas	92,8-93,4
Jatropha saulėgražų	Novozym - 435	Etilo acetatas	-	91,3
		Etilo acetatas	-	92,7
Mikrodumblių	Įvairios komercinės lipazės	Ilgų-grandinių alkoholiai	Heksanas	-
Atliekų aliejai (2,5 % laisvų RR)	Novozym 435	Metanolis	-	>90
Rūgštūs aliejai (77,9 % laisvų RR)	Novozym 435	Metanolis	-	>90
Sojos pupelių distiliatas (28 % laisvų RR)	Novozym 435 Lipozime TL IM	Metanolis	<i>t</i> -butanolis	Apie 95 %

#### 1.8.4.2 Reakcijos sąlygų svarba

Fermentinės biodyzelino sintezės reakcijos išeią ir fermento stabilumą lemia daug įvairių veiksnių: aliejaus rūšis, reakcijos temperatūra, acilakceptorius pasirinkimas, jo ir aliejaus molinis santykis, vandens kiekis sistemoje (vandens aktyvumas) ir organinio tirpiklio buvimas/nebuvimas. Optimalios sąlygos yra skirtingos, priklausomai nuo naudojamos lipazės tipo (produkuojančio mikroorganizmo, lipazės formos – skysta imobilizuota), aliejaus sudėties (ir jame esančių priemaišų) ir reaktoriaus tipo [73]. Pagrindiniai lemiantys veiksniai yra lipazės pasirinkimas ir jos stabilizacijos (imobilizacijos) būdas, substratų pasirinkimas ir reakcijos sąlygų pasirinkimas (tirpiklio naudojimas, molinis substratų santykis ir temperatūra), antriniai lemiantys veiksniai yra vandens kiekis, reakcijos priedai, fermento

mikroaplikos pH ir glicerolio koncentracija (1.14 pav.). Šie veiksniai sąveikauja tarpusavyje ir pakeitus vieną iš jų rezultatas gali drastiškai pasikeisti.



1.14 pav. Pagrindiniai veiksniai, lemiantys fermentinės biodyzelino sintezės išeią

Nėra nustatytų taisyklių, kaip geriausiai pasirinkti reakcijos sąlygas, pasirinkus substratus ir fermento preparatą, tačiau egzistuoja tam tikros tendencijos, todėl kai kurie kintamieji (tirpiklio, alkoholio pasirinkimas, temperatūra, lipazės forma) bus aptarti plačiau.

**Tirpiklis.** Pagrindinės priežastys, dėl kurių organinis tirpiklis yra dedamas į aliejaus-alkoholio reakcijos mišinį yra abiejų substratų tirpumo ir lipazės stabilumo padidinimas. Esant organiniam tirpikliui nebereikia alkoholio įvesti dalimis (ypač metanolio, kuris greitai inaktyvuoja fermentus), tačiau pasibaigus reakcijai tirpiklio pašalinimas gali sukelti sunkumų [173]. Pastebėta, kad *C.antarctica* atveju didžiausios biodyzelino išeišos gaunamos naudojant *n*-heksaną, o mažiausios – polinius tirpiklius, tokius kaip acetonas. Kitų fermentų atveju didelės išeišos gautos naudojant 1,4-dioksaną. *tret*-Butanolis – dažnai naudojamas tirpiklis biodyzelino fermentinei sintezei.

Pastebėta, kad esant *tret*-butanolio žymiai sumažėja neigiama metanolio ir glicerolio įtaka fermentui, nes abu junginiai gerai jame tirpsta [73]. Nepaisant daug žadančių rezultatų, tirpiklių naudojimo reikėtų vengti dėl jų toksiškumo, degumo, neigiamo poveikio aplinkai bei būtinybės juos pašalinti iš reakcijos sistemos. Ši šalinimo procedūra dar padidintų produkto kainą, todėl, norint, kad fermentiniai procesai galėtų konkuruoti su cheminiais, dėmesys turėtų būti koncentruojamas į betirpikles sistemas [73].

**Alkoholis.** Įprastai acilakceptoriais naudojami alkoholiai, dažniausiai metanolis, antroje vietoje – etanolis, kiti alkoholiai – propanolis, butanolis, izopropanolis, *tret*-butanolis, šakoti alkoholiai ir oktanolis – taip pat gali būti naudojami, tačiau jie kur kas brangesni. Renkantis tarp metanolio ir etanolio, pirmasis yra kur kas pigesnis, reaktingesnis, o jo RR metilo esteriai yra lakesni, nei etilo esteriai. Kita vertus, etanolis mažiau toksiškas bei gali būti laikomas atsinaujinančiu produktu, nes nesudėtingai gaunamas iš atsinaujinančių šaltinių fermentacijos būdu. Metanolis, priešingai, gaunamas iš neatsinaujinančių šaltinių, tokių kaip gamtinės dujos. Lyginant RR etilo ir metilo esterius, pirmųjų klampumas yra šiek tiek didesnis, drumstimosi ir ribinė filtruojamumo temperatūros šiek tiek pastesnės, nei metilo esterių [163]. Problema yra ta, kad alkoholiai yra konkurenciniai lipazių slopikliai, nes biodyzelino gamyba dažniausiai vykdoma sąlyginai koncentruotuose substratų tirpaluose, idealiau atveju betirpiklėse sistemose. Aliejuje tirpsta tik apie pusę stecheometriškai reikalingo metanolio kiekio, todėl praktiniu atveju reikėtų dėti tik apie trečdalį reakcijai reikalingo metanolio vienu kartu [21]. Pakeitus metanolį etanolium, ir jį pakartotinai grąžinant į reakcijos mišinį galima padidinti konversijos efektyvumą [37]. Dėl fermentų jautrumo metanoliumi, buvo atlikti šakotų ir ilgagrاندžių alkoholių tyrimai. Kuo ilgesnė alkoholių, sudarančių RR esterius, grandinė, tuo didesnis cetano skaičius ir šilumingumas. Be to, antrinių ar šakotų alkoholių RR esteriai gali būti naudojami kaip kuro priedai, mažinantys užšalimo temperatūrą, taip pat drumstimosi bei ribinę filtruojamumo temperatūras [174, 175]. Alkoholių pakeitimas kitais acilakceptoriais -

esteriais, pavyzdžiui metilo, etilo acetatu, turi teigiamą įtaką reakcijai (lipazės neinaktyvuojamos, sumažėja reakcijos trukmė, šalutinis produktas, pavyzdžiui triacetinas – geras kuro priedas, apsaugantis nuo variklių kalimo, pagerina kuro savybes šaltyje), tačiau jį reikia naudoti didesniais stecheometriniais santykiais [73], be to, pramoniniame procese svarbi kaina.

**Glicerolis.** Šis trihidroksilis alkoholis yra šalutinis reakcijos produktas ir iš dalies lemia lipazių aktyvumo sumažėjimą. [163]. Jis gali sukelti imobilizuotų fermento dalelių porų užsikimšimą, fermento aplipimą ir inaktyvaciją [21]. Kai kurie autoriai siūlo šalinti glicerolį dializės būdu [176] ar ekstrahuojant izopropanoliu [177]. Tačiau glicerolis gali ne tik sudaryti problemų, bet ir būti panaudojamas – fermentinės biodyzelino sintezės metu dažniausiai susidaro aukštos kokybės glicerolis, kurį galima naudoti kaip pradinį junginį įvairioms sintezės reakcijoms [21].

**Temperatūra.** Bendru atveju temperatūros didinimas lemia didesnę reakcijos greitį. Pasiėkus optimumą, tolesnis temperatūros didinimas lemia fermentinio aktyvumo sumažėjimą dėl fermento denatūracijos ir/ar inaktyvacijos. Parodyta, kad fermentų imobilizacija lemia temperatūros optimumo pasislinkimą į didesnių verčių pusę. Panašu, kad imobilizacija lipazių molekulėms suteikia standesnę išorinę karkasą, dėl kurio jos tampa stabilesnės ir aktyvesnės aukštesnėse temperatūrose [178]. Reakcijos temperatūra gali kisti nuo kambario temperatūros, iki temperatūrų, aukštesnių, nei 60 °C. Optimali reakcijos temperatūra tam pačiam fermentui gali skirtis: pavyzdžiui, naudojant TLL, saulėgrąžų aliejaus metanolizės be tirpiklio optimali temperatūra buvo 50 °C [136], o sojų aliejaus etanolizė be tirpiklio geriausiai vyko 31,5 °C, RML katalizuojama sojų aliejaus metanolizė geriausiai vyko žemesnėje, nei 40 °C [136], o palmitino rūgšties esterinimas etanoliu - 67 °C [179]. Todėl kiekvienai naujai reakcijos sistemai optimalią temperatūrą praktiškai reikia nustatyti empiriškai iš naujo.



**Vandens įtaka.** Vandens kiekis sistemoje turėtų būti pasirinktas siekiant kompromiso tarp hidrolizės reakcijos minimizavimo ir lipazės aktyvumo maksimizavimo, ir vėlgi turi būti nustatytas kiekvienai reakcijos sistemai atskirai [118]. Įvairių biodyzelino sintezės tyrimų metu nustatytas optimalus vandens kiekis labai varijuoja, pavyzdžiui kai kuriais atvejais maksimaliai biodyzelino išėigai reikalingas vandens kiekis yra virš 80 % (*Rhizopus oryzae* lipazė) [65], kitais - mažiau, nei 0,2 % (*Thermomyces lanuginosus* lipazė) [64] aliejaus masės. Vandens įtaka lipazių katalizuojamoms reakcijoms detaliai aprašyta 1.5 skyriuje.

**Fermento forma. Imobilizacija.** Ekonomiškumas yra svarbiausias kriterijus, norint pritaikyti procesą pramonėje, todėl lipazės turi būti naudojamos pakartotinai. Taigi imobilizavimas yra itin svarbus veiksnys, nes netirpias (imobilizuotas ant kietų dalelių) lipazes lengva pašalinti iš reakcijos sistemos ir naudoti kelis kartus. Žymią lipazės preparato kainos dalį sudaro nešiklio kaina, todėl ieškoma pigesnių nešiklių, tokių, kaip silikagelis, celitas, kaolinitas – alternatyvos brangioms organinėms dervoms. Dar vienas būdas sumažinti fermentinio preparato kainą – naudoti visos ląstelės, produkuojančios lipolizinį fermentą, imobilizaciją, išvengiant išlaidų lipazių gryninimui iš fermentacijos terpės [163]. Imobilizacijos būdai plačiau aprašyti 1.10 skyriuje. Kita vertus, ne visada imobilizacija ir daugkartinis fermentų panaudojimas yra pigiausia alternatyva: pirmajame fermentiniame biodyzelino reaktoriuje JAV (Piedmont biofuels) naudojamas skystas fermentas, todėl jis nėra inaktyvuojamas gliceroliu ir taip užtikrinama galimybė naudoti jį nepertraukiamam procesui ilgą laiką (mėnesiais), šiuo atveju naudojama ypatinga patentuojama vandens ir metanolio šalinimo technologija [172].

### **1.9 Kvapiųjų esterių fermentinė sintezė**

Trumpų grandinių riebalų rūgščių alkilo esteriai yra vieni svarbiausių ir universaliausių natūralių skonių ir kvapų komponentų. Jie plačiai naudojami maisto, gėrimų, kosmetikos ir farmacijos pramonėse. Nors kvapieji esteriai

šiuo metu gaminami cheminės sintezės būdu, vis didėja natūralių kvapiklių paklausa. [53].

Maisto produktų aromataž lemia įvairūs junginiai: alkoholiai, aldehydai, esteriai, dikarbonilai, trumpos ir vidutinio ilgio riebalų rūgštys, metilketonai, laktonai, fenoliniai junginiai ir sieros junginiai [180].

Svarbiausi yra etilo esteriai, be jų maisto pramonėje dažnai naudojami metilo, propilo, butilo, izobutilo, amilo ir izoamilo, geranilo esteriai [21, 181].

Pramoniniams tikslams naudoti natūralius esterius, ekstrahuotus iš augalų, dažniausiai yra per brangu, nes jų kiekiai yra per maži [182]. Augaluose esterius sintetina lipazės ar esterazės iš amino rūgščių ar riebalų rūgščių [183], todėl esterių sintezei panaudojus fermentus, priešingai nei cheminės sintezės atveju, juos galima žymėti kaip „natūralius“ [21, 53]. Kitas cheminės sintezės trūkumas – nepageidaujami šalutiniai produktai, spalviniai nešvarumai ir kt. [184]. Be to, kaip ir kitos cheminės pramonės šakos, kvapų ir skonių pramonė siekia sumažinti atliekų apdorojimo kaštus, vienas iš būdų – naudoti aplinkai palankius procesus [185].

Skaičiuojama, kad daugiau nei 85 % sintetinių kvapiųjų esterių kilogramo kaina rinkoje yra 10-100 JAV dolerių, todėl bet kuris naujas rafinuotas sintezės metodas turi būti ir pigus [186]. Kita vertus, pirkėjai vis labiau yra linkę mokėti didelę kainą už „organinius“, „natūralius“ produktus [187].

Literatūroje aprašyti įvairūs darbai, kuriuose kvapieji esteriai sintetinami naudojant lipazes [53, 133, 188], dažnai naudojama RML (1.8 lentelė). Kaip ir kitais atvejais, geriausias sintezės būdas yra be tirpiklio, tačiau tai įmanoma ne visais atvejais dėl substratų ar produktų inaktyvuojančio poveikio fermentui. Tuomet fermentinė kvapiųjų esterių sintezė daržniausiai atliekama nepoliniuose organiniuose tirpikliuose (*n*-heksane, heptane, cikloheksane, izooktane ar toluene) ar net dvifazėse sistemose su vandeniu. Joniniai skysčiai turi daugiau privalumų nei įprastiniai tirpikliai, tačiau iš jų sunkiau išskirti reakcijos produktą. Daug privalumų turi ir superkritiniai skysčiai, kurių

savybes lengva keisti (keičiant temperatūrą arba slėgį) - jie nedegūs, netoksiški, lengva sukurti produkto gryninimo schemą [133].

1.8 lentelė. Kvapiųjų esterių sintezės reakcijų pavyzdžiai, naudojant RML

Sintetinamas esteris	Konversija	Reakcijos sąlygos	Reakcijos terpė	Fermento forma	Literatūros šaltinis
Izoamilacetatas	25-40 %	40-55 °C, 24 val.,	Be tirpiklio, heksanas	Imobilizuota ant polistiren- $\beta$ -glicidilmetakrilato	[189]
Izoamilacetatas	95 %	40 °C, 72 val., 0,06 M substratų konc., fermento konc. 3 g/l	n-heptanas	Imobilizuota (Lipozyme IM - 20)	[190]
Izoamilbutiratas	90-96 %	40 °C, 24-72 val., fermento/substrato santykis (50-200 g/mol)	n-heksanas	Lipozyme IM-20	[191]
Izoamilizovaleratas	85 %	50 °C, 144 val., fermento konc. 10 g/l, substratų konc. 0,5 M, 0,75M	n-heksanas	Lipozyme IM-20	[192]
(Z)-3-Hexen-1-il butiratas	95 %	60 °C, 4-6 h, fermento konc. 17 %	n-heksanas	Lipozym IM,	[193]
Geranilacetatas	50-77 %	50 °C, 5h, fermento konc. 10 %	Be tirpiklio	Lipozyme IM	[194]
Citronelilacetatas	78-90 % ee	30 °C, 4 val. fermento konc. 10 %, vinilacetato molinis perteklius 1:6	Be tirpiklio	Propanoliu perplautas Lipozyme RM IM	[195]
(R)-(+)- $\beta$ -Citronellyl acetate	30-45 % konversija				

### 1.9.1 Fenetiloktanoato paplitimas ir sintezė

Fenetiloktanoatas (sinonimai: 2-feniletiloktanoatas, fenetilkaprilatas) – saldaus, vaško, šiek tiek kakavos ir karamelės kvapo esteris, su vyno ir konjako atspalviais, skonis – saldus, vaisinis, grietinėlės, šiek tiek pienoškas su gėlių atspalviu [196]. FEO natūraliai aptinkamas vyne ir stipriuosiuose alkoholiniuose gėrimuose (3 metų senumo Fino chereše vyne 0.2 mg/l) [197, 198], okros sėklų luobelėje (0,2 %) [199]. Kai kurios skruzdžių rūšys (*Camponotus arminius* ir *Crematogaster clarithorax*) naudoja fenetiloktanoatą savo komunikacijos sistemoje [200], jo pėdsakai randami baltažievės pušies (*Pinus heldreichii*) eteriniuose aliejuose (0,04 %) [201].

Literatūroje aprašyta lipazių atranka, kuomet fenetiloktanoatas susintetintas fermentiniu būdu iš natūralaus substrato (kokosų riebalų), turinčio oktano rūgštis: [202]. Kokosų riebalai yra nebrangi natūrali medžiaga, kurią, panaudojus lipazių biotechnologiją, galima perdirbti į aromatinių savybių turintį produktą, skritą ne tik kvapų ir kvėpalų gamybai (ypač po gryninimo),

bet ir tiesiogiai maisto produktams gaminti, pavyzdžiui, sūriui [203]. Iš penkių komercinių lipazių atrinkti labiausiai tinkami preparatai: Palatase 20 000 L (RML) ir „AYS Amano“ (*Candida rugosa* lipazė). Autoriai teigia, kad tyrimus reikia tęsti, optimizuoti reakcijos sąlygas ir sukurti ekonomišką procesą [202]. Be to, minėtame tyrime nebuvo naudotos imobilizuotos lipazės, kas galėtų būti vienas iš efektyvesnių fermentų panaudojimo sprendimų.

## **1.10 Lipazių imobilizacija**

### **1.10.1 Lipazių imobilizacijos būdų apžvalga**

Fermentų imobilizacija – tai jų lokalizavimas ar pritvirtinimas ant prie nešiklio ar matricoje [73]. Pagal apibrėžimą, katalizatorius padeda greičiau pasiekti reakcijos pusiausvyrą, tuo tarpu jis pats nėra sunaudojamas. Jei fermentas ar kito tipo katalizatorius yra ištirpinamas reakcijos terpėje, dažniausiai jį tampa sunku atskirti bei pakartotinai panaudoti, taigi jis nebeatitinka katalizatoriaus sąvokos apibrėžimo. Todėl fermentų imobilizavimas dažnai yra paprasčiausias būdas, suteikiantis galimybę juos išsaugoti ir naudoti pakartotinai [58].

Pagrindinė kliūtis, apsunkinanti lipazių taikymą pramonėje, yra didelė biokatalizatorių kaina, todėl lipazių imobilizavimas, leidžiantis naudoti tą patį katalizatorių ilgą laiką, yra būtinas pramoniniam jų taikymui. Kitas imobilizavimo tikslas – pagerinti lipazių savybes, tokias kaip termostabilumas ir aktyvumas organinėje terpėje, taip pat palengvinti darbą su jomis, atskyrimą nuo reakcijos mišinio ir reakcijos produktų gryninimą [73].

Daugelis lipazių yra imobilizuotos ir platinamos komerciniu būdu, visos jos – užląstelinės. Iš pramoninių preparatų dažniausiai naudojami yra Novozym 435 (CALB ant makroporinės akrilinės dervos), Lipozyme RM IM (RML ant anijoninės dervos) ir Lipozyme TL IM (TLL, imobilizuota ant granuluoto silikagelio) [163].

Norint pasirinkti geriausią imobilizavimo metodą, svarbu atsižvelgti į šiuos veiksnius:

- imobilizavimo metu neturėtų vykti fermento inaktyvacija;
- po imobilizacijos fermentas neturėtų atsiplauti nuo nešiklio;
- lipazė turėtų būti visiškai aktyvioje formoje;
- masių pernašos apribojimai turėtų būti nereikšmingi.

Pirmieji du veiksniai kartais sunkiai suderinami. Kovalentinis fermento prijungimas prie nešiklio ar skersinis susiuvimas yra geriausi būdai norint išvengti fermento atsiplovimo, tačiau dažnai jie sukelia inaktyvaciją. Norint lipazes taikyti organinėje terpėje, dažniausiai pakanka nekovalentinės imobilizacijos, nes lipazės nėra tirpios organinėje terpėje ir lieka imobilizuotos preparate [21].

Hanefeld ir kt. [58] imobilizacijos būdus suskirstė į penkias kategorijas, kiekviena iš jų turi savo privalumus ir trūkumus:

- 1) nekovalentinė adsorbicija ir depozicija;
- 2) joninės sąveikos lemiamą imobilizaciją;
- 3) kovalentinis prijungimas;
- 4) skersinis fermento susiuvimas;
- 5) įterpimas į polimerinį gelį ar kapsulę.

Kiti autoriai imobilizaciją, lemiamą joninės sąveikos, priskiria adsorbicijai [204].

Nešiklio prigimtis smarkiai veikia fermento katalitines savybes – aktyvumą, selektyvumą, stabilumą [205]. Fermento imobilizavimas sąlygojamas dviejų dedamųjų – fermento ir nešiklio sąveikos, todėl svarbios jų abiejų paviršiaus savybės. Fermento paviršiaus savybes lemia aminorūgščių polinės grupės bei nepolinis paviršiaus plotas, todėl nešiklis gali būti paruoštas taip, kad atitiktų šias savybes.

Pagrindinis reikalavimas nešikliui – didelis paviršiaus plotas. Jį gali turėti arba mažo dydžio dalelės (deja, vėliau jas gali būti sunku atskirti) arba labai poringos medžiagos, kurių porų dydis būtų pakankamai didelis, kad neapribotų substratų difuzijos. Be to, nešiklis turi būti chemiškai ir mechaniškai stabilus [58]. Tinkamas porų dydis yra apie 100 nm, o difuzijos kelias neturėtų būti per ilgas, taip pat neturėtų būti kliūčių substratų ir produktų difuzijai. Kuomet fermentai yra dalelių viduje, dalelių dydis turėtų būti kuo mažesnis, tačiau reikia rasti kompromisą tarp patogaus naudoti dalelių dydžio ir geros difuzijos [21].

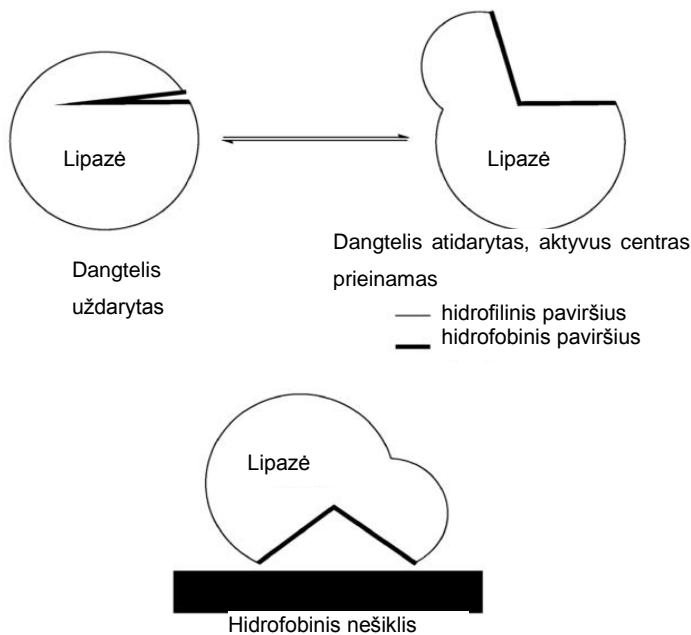
Šiame skyriuje bus apžvelgti pagrindiniai imobilizacijos būdai ir principai.

### **1.10.2 Nekovalentinė adsorbcija ir nusodinimas**

Adsorbcija yra dažniausiai naudojamas lipazių imobilizavimo metodas, nes procedūra yra paprasta, sąlygos – švelnios, o metodas – pigus [73]. Fermento tirpalas (dažniausiai vandeninis) paprasčiausiai sumaišomas su nešikliu ir, jei fermento – nešiklio sąveika yra pakankamai stipri, įvyksta adsorbcija [21]. Lipazių atveju imobilizacija dažniausiai vyksta dėl hidrofobinės sąveikos, tačiau taip pat gali būti panaudojama joninė sveika su jonų mainų medžiagomis [206]. Fermentai, turintys didelį lipofilinį paviršiaus plotą, gerai sąveikauja su hidrofobiniu nešikliu, van der Waals'o jėgos ir entropijos pokyčiai užtikrina fermento imobilizaciją ant nešiklio. Didelį hidrofiliinį paviršiaus plotą turintys fermentai gerai sąveikauja su hidrofiliniu nešikliu. Entropijos ar vandenilinių ryšių lemiamos imobilizacijos privalumas yra tas, kad fermentas neturi būti kaip nors paruoštas ar chemiškai modifikuotas prieš procedūrą ar jos metu [58]. Adsorbcijai netgi įmanoma naudoti neišgrynintus fermentų ruošinius, nes lipazės ant hidrofobinių paviršių adsorbuojasi geriau nei dauguma kitų baltymų, todėl šis metodas gali būti naudojamas kaip gryninimas ir imobilizavimas tuo pačiu metu [21].

Kai fermentas imobilizuojamas ant hidrofobinio nešiklio, vienintelė sąveika tarp fermento ir nešiklio yra van der Waals'o jėgos. Jos yra gana silpnos ir tai nėra tikroji varančioji imobilizacijos jėga. Šiuo atveju imobilizacija yra lemiamą entropijos pokyčių, nes viena fermento molekulė atpalaiduoja daug vandens molekulių nuo savo ir nešiklio paviršiaus. Kad imobilizacija būtų efektyvi, tiek nešiklis, tiek fermentas turi turėti didelį lipofilinį paviršiaus plotą [58].

Lipazėms yra būdingos hidrofobinės baltymo paviršiaus dalys. Manoma, kad lipazių imobilizacija ant hidrofobinių nešiklių imituoja jų paviršiaus aktyvumą hidrofobiniais substratais, todėl jos imobilizuojamos su atviru dangteliu, aktyvioje konformacijoje (1.15 pav.) [48, 207]. Reikia paminėti, kad iki šiol tai nebuvo įrodyta [58]. Tačiau ant hidrofobinių nešiklių adsorbcijos būdu imobilizuotos lipazės gali būti 400 kartų aktyvesnės, nei natyvus fermentas [208].

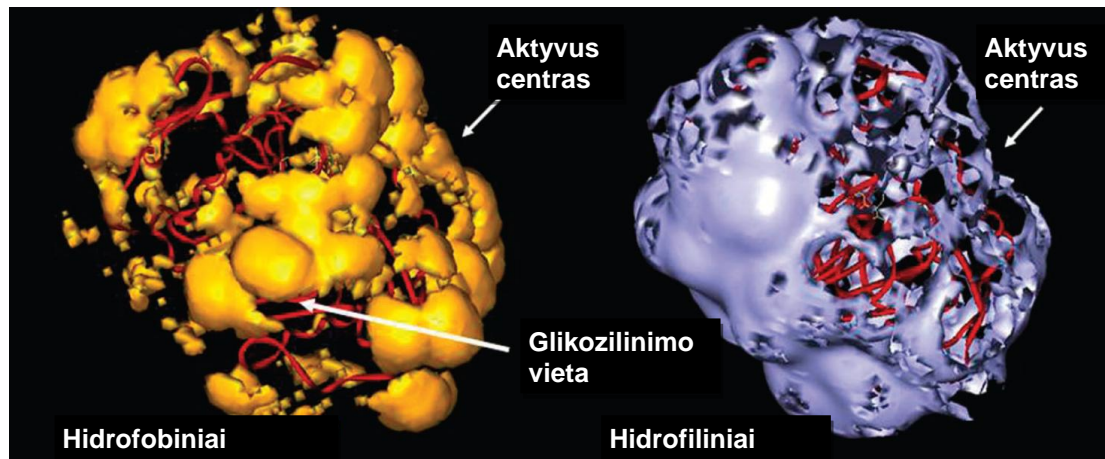


1.15 pav. Spėjamas lipazių imobilizacijos ant hidrofobinių nešiklių principas. Manoma, kad lipazės, imobilizuotos ant hidrofobinių nešiklių, yra savo aktyvioje konformacijoje [58].

Ant hidrofilinių nešiklių imobilizuojami fermentai sąveikauja susidarant vandeniliniams ryšiams tarp nešiklio ir jų hidrofilinių aminorūgščių radikalų ar glikozilintų dalių (jei yra). Šiuo atveju imobilizacijos priedai (angliavandeniai,

polietilenglikolis ar albuminas) dažnai stabilizuoja fermentą ir apsaugo nuo neigiamos tirpiklių įtakos [58]

Tikėtina, kad to paties fermento orientacija ant hidrofobinių ir hidrofilinių nešiklių gali būti labai skirtinga, be to, baltymų konformacija kinta imobilizavimo metu [58]. CALB paviršiaus savybės (hidrofobiniai ir hidrofiliniai regionai) pateiktos 1.16 pav.



1.16 pav. CALB hidrofobiniai ir hidrofiliniai paviršiaus regionai galintys turėti įtakos imobilizavimui [209].

Adsorbacijai naudojami nešikliai:

- poringi neorganiniai nešikliai: diatomitas (celitas), hidroksilapatitas, aliuminio oksidas, mezoporinis silicio dioksidas
- organiniai polimerai: akrilatų pagrindu, stireno-divinilbenzeno pagrindu, poringas polipropilenas, alginatas [21].

Kaip atskirą adsorbacijos rūšį galima išskirti baltymais „apvilktus“ mikrokristalus. Tai - organinėje terpėje labai aktyvūs fermentų preparatai, kurie gaunami fermento vandeninį tirpalą sumaišius su koncentruotu neorganinės druskos (ar kartais cukraus ar aminorūgšties) tirpalu ir lėtai įpylus į besimaišantį su vandeniu organinį tirpiklį. Susidaro nešiklio kristalai su paviršiuje nusėdusiu fermentu. Kristalų dydis tik 0,1-5 $\mu$ m, dėl to vyksta efektyvi masių pernaša [21].



Nusodinimas – taip pat viena iš adsorbcijos atmainų, tik šiuo atveju fermento tirpalas paliekamas išdžiūti ant nešiklio, nedalyvauja hidrofobinės sąveikos ar entropijos lemiami veiksniai. Šiuo būdu ruošiama dauguma fermentų, imobilizuotų ant celito [58].

Reikia turėti omenyje, kad imobilizuojant adsorbcijos būdu, priklausomai nuo fermento ir imobilizavimo sąlygų, gali būti prarandama dalis veiklių aktyvių centrų [21]. Kitas žymus adsorbcijos trūkumas – fermento atsiplovimas nuo nešiklio vandeninėje aplinkoje (organinėje terpėje dėl mažo baltymų tirpumo fermentas neatsiplauna) [58].

### **1.10.3 Joninis prisijungimas**

Ši imobilizacijos rūšis - tiesioginis chromatografijos principų taikymas baltymo-ligando sąveikai sukurti. Vieni pirmųjų bandymų grįžtamai imobilizuoti fermentus buvo jonų mainams skirtų medžiagų panaudojimas nešikliams [204]. Priklausomai nuo baltymo krūvio, jonų mainams naudojama medžiaga turi būti neigiamai ar teigiamai įkrauta [58]. Nors metodas paprastas, tačiau sudėtinga rasti sąlygas, kuriomis fermentas būtų ir stipriai prikabintas, ir visiškai aktyvus [204]. Tiek imobilizavimo metu, tiek naudojant imobilizuotą preparatą labai svarbi yra pH vertė ir druskų koncentracija, nes dėl didelės druskų koncentracijos fermentas gali atsiplauti nuo nešiklio [58]. Imobilizuojant šiuo būdu gali pakisti fermentų pH optimumas bei pH stabilumas [210], tačiau tuo galima ir pasinaudoti, norit pastumti tam tikro fermento pH optimumą į kurią nors pusę [211].

### **1.10.4 Kovalentinė imobilizacija**

Kovalentinė imobilizacija – tai negrįžtamas fermento prijungimas prie nešiklio, taip apsisaugant nuo baltymo atsiplovimo į reakcijos sistemą [73]. Tvirtas prijungimas ir yra didžiausias kovalentinės imobilizacijos privalumas, nes taip galima apsaugoti reakcijos produktus nuo užteršimo baltymais. Remiantis bendra taisykle kovalentinę imobilizaciją reikia rinktis, kai fermentus ketinama naudoti vandeniniuose tirpaluose ar denatūruojančiomis

sąlygomis. Daugelio kovalentinių ryšių susidarymas tarp fermento ir nešiklio sumažina konformacinį lankstumą ir terminius judesius, taip apsaugodamas baltymą nuo išsivyniojimo ir denatūracijos [58]. Kovalentinė imobilizacija dažnai sukelia tam tikro laipsnio fermento inaktyvaciją. Ši inaktyvacija gali būti kritinė, jei imobilizacijos metu kovalentiškai modifikuojamos katalizei būtinos fermento funkcinės grupės. Jei naudojamas kovalentinis prijungimas per daugelį baltymo taškų, nors ir yra inaktyvacijos rizika, lipazė turi būti imobilizuojama aktyvioje konformacijoje, nes vėliau jos pakeisti negalima [21]. Planuojant kovalentinės imobilizacijos procedūrą svarbu atsižvelgti į visus pradinio fermentinio preparato komponentus. Dažnai fermentai yra neišgryninti, be to, turi įvairių priedų (poliolių, angliavandenių), todėl tikslinio baltymo kiekis gali būti labai mažas (<5 %) ir kitų junginių sąveikos gali būti žymios ir turi būti numatytos [58].

Kovalentinė imobilizacija dažniausiai vykdoma dviem etapais: nešiklio aktyvavimas ar modifikavimas (chemiškai aktyvių grupių įvedimas) ir baltymo prijungimas prie aktyvuoto paviršiaus [73].

Dažniausiai kovalentiniam prijungimui pasinaudojama baltymo paviršiuje esančiomis amino grupėmis, tačiau gali būti prijungiamos ir kitos funkcinės grupės, taip pat cukraus liekanos. Amino grupė gali nukleofiliškai atakuoti epoksido ar aldehido grupę [58].

Nešikliai, turintys karboksi grupes (pavyzdžiui polimeriniai akrilo rūgšties dariniai), aktyvuojami karbodiimidu, tuomet su fermentu susidaro peptidiniai ryšiai. Amino grupes turintys polimerai gali būti aktyvuoti įvedant diazo grupes, tuomet fermentai dažniausiai prijungiami per amino grupes, kartais sulfo, hidroksi, karboksi grupes bei histidino imidazolo žiedą. Vienas dažniausiai taikomų metodų aktyvuoti nešiklio amino grupėms yra aktyvavimas glutaraldehydu [73]. Klasikinis imobilizavimo metodas - nešikliai agarozės pagrindu, aktyvuoti bromcianu [21].

Kuriami epoksi grupės turintys nešikliai. Šios grupės gali reaguoti su įvairiomis baltymo nukleofilinėmis grupėmis (amino, hidroksilo, sulfhidrilo) esant labai švelnioms sąlygoms: neutraliam pH ir žemoms temperatūroms [212]. Dalis komerciškai prieinamų aktyvuotų nešiklių, skirtų fermentų imobilizacijai, sukurti su epoksi grupėmis [21].

Kaip ir nekovalentinės imobilizacijos atveju, nešikliai gali būti tiek hidrofobiniai, tiek hidrofiliški. Be to, reaktingos grupės prie nešiklio gali būti prijungtos per trumpus arba ilgus intarpus. Ilgesni intarpai gali lemti didesnę baltymo konformacinę lankstumą, trumpesni – geresnę termostabilumą, nes jie apriboja fermento judrumą ir apsaugo nuo išsivyniojimo [58].

#### **1.10.5 Fermento skersinis susiuvimas**

Fermento skersinį susiuvimą (angl. *crosslinking*) galima laikyti ekstremaliu kovalentinio prijungimo atveju, kai fermento molekulės sujungiamos tarpusavyje bifunkciniu reagentu, tokiu kaip glutaro aldehidas. Fermentas tarnauja nešikliu pats sau [58]. Tipinis skersai susiūto fermento preparatas sudarytas tik iš fermento, tačiau skersinis susiuvimas gali būti naudojamas kartu su kitais imobilizacijos metodais, pvz. adsorbicija, norint išvengti atsiplovimo. Dažnai sutinkamos skersai susiūto fermento formos – skersai susiūti fermento kristalai ir skersai susiūti fermento agregatai [21]. Pirmiausia gaunami fermento kristalai ar jis išsodinamas (agregatai) ar išdžiovinamas fermento aerosolis (tačiau netgi tirpale esantis fermento preparatas gali būti skersai susiūtas), tuomet pridedama „susiuvėjo“ [58]. Kaip ir kitų kovalentinės modifikacijos procedūrų atveju, fermentas gali būti inaktyvuojamas. Nėra bendro metodo, kuris galėtų būti pritaikytas bet kuriam fermentui, todėl dažniausiai tinkamos sąlygos randamos bandymų – klaidų keliu. Svarbu atsiminti, kad fermentas turi būti stabilus iki imobilizacijos, jos metu ir po jos [21, 58].

### **1.10.6 Įterpimas į gelį ar kapsulę**

Lipazės, imobilizuotos įterpimo būdu, yra stabilesnės už adsorbuotas. Įterpimas – tai lipazės apsupimas ir uždarymas polimero matricoje, kurios poringos struktūros ypatybės garantuoja fermento sulaikymą viduje, tačiau leidžia difunduoti substratams ir produktams. Šio metodo procedūra gana paprasta, yra nemažas įvairių natūralių ir organinių nešiklių pasirinkimas: alginatas, agarozė, želatina, filosilikatinis zolis-gelis [73].

Plačiausiai paplitęs – zolių-gelių metodas. Zoliai-geliai – tai labai poringi ir greitai paruošiami silicio junginiai: tai chemiškai inertiškas stiklas, kuris gali būti suformuojamas pagal poreikį. Nors zoliai-geliai gali būti termiškai ir mechaniškai atsparūs, dažniausiai jie yra trapūs [58]. Imobilizuojant šiuo būdu, fermento vandeninis tirpalas sumaišomas su hidrolizuojamais organiniais silanų dariniais (pvz. tetrametoksisilanas, alkiltrimetoksisilanas), norint gauti didelį imobilizuotų lipazių aktyvumą, reakcijos mišinyje būtina naudoti silanus su viena ar keliomis alkilo (metilo – oktadecilo) ir arba arilo grupėmis. Gautas gelis išdžiovinamas ir susmulkinamas į reikalingo dydžio daleles, praplaunamas vandeniu ir organiniais tirpikliais [21].

Įterpimas į organinius polimerus - tai klasikinis būdas imobilizuoti fermentus. Tirpale kuriame yra polimerizavimui skirti monomerai ir fermentas, vykdoma polimerizacija ir skersinis susiuvimas, tokiu būdu fermentas įterpiamas į polimero tinklą. Galima tikėtis dalinės fermento inaktyvacijos dėl jo cheminės modifikacijos ir/arba aukštos temperatūros polimerizacijos metu. Šis metodas tirtas gana menkai, galbūt dėl to, kad ant organinių polimerų lipazės pavyksta labai gerai adsorbuoti [21].

### **1.10.7 Paviršiaus aktyviomis medžiagomis padengtos lipazės**

Paviršiaus aktyviomis medžiagomis (PAM) ar lipidais padengtos lipazės, kurios nėra tirpios reakcijos terpėje, gali būti laikomos imobilizuotomis lipazėmis, PAM atliekant nešiklio funkciją [213]. Metodas yra paprastas, jo esmė – sumaišius lipazės ir PAM vandeninius tirpalus, PAM padengtos lipazės

iškrenta į nuosėdas, kurios išdžiovinamos. Pasirenkant PAM, reikia atsiminti, kad kai kurios PAM (turinčios esterines jungtis) yra skaidomos lipazių. Lyginant su grynomis lipazėmis, PAM padengtų lipazių aktyvumas yra gerokai didesnis [21].

#### **1.10.8 Imobilizacija ant nanonešiklių**

Fermentai, ypač hidrolazių klasės, vis dažniau imobilizuojami ant nanostruktūrų, jie tampa aktyvesni ir stabilesni laikymo, temperatūros atžvilgiu. Dažniausiai naudojami nešikliai – nanodalelės, nanopluostas, nanovamzdeliai, nanoporos, nanoklostės ir nanokompozitai. Šie nanonešikliai iš prigimties pasižymi labai dideliu paviršiaus plotu, dėl kurio įmanomas didelis įsotinimas fermentu ir didelis tūrinis fermento aktyvumas. Taip pat dėl gero atsparumo įtempimui nanomedžiagos dažniausiai yra atsparios mechaniniam dėvėjimuisi reaktoriuose [214]

Nešiklių ir fermentų nanomatmenys leidžia fermentams, prisijungusiems prie nanogriaučių, turėti tirpių fermentų savybes [215]. Imobilizuotos nanodalelės elgiasi kaip stabilios monodisperguotos dalelės vandeninėje suspensijoje ir pasižymi Brauno judesiais [216]. Masių pernaša yra kur kas geresnė naudojant nanomatmenų matricą, nei makromatmenų nešiklius [217]. Naudojant magnetinius nanonešiklius, imobilizuoto fermento atskyrimas tampa greitas ir efektyvus, todėl paprastesnis antrinis katalizatoriaus panaudojimas [218]. Nanopluostas yra ypatingai tinkamas įvairaus tipo reaktoriams, nes jį nesunku paruošti ir naudoti. Nanopluosto membranų reaktoriai pasižymi nedideliu slėgio kritimu ir dideliu tekėjimo greičiu. Todėl ateityje nanotechnologijos ir biotechnologijos sandūroje tikimasi didelių pasiekimų [214].

## 2 MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

**Lipazės.** *Enterobacter aerogenes* - 13 lipazė gauta iš UAB „Biocentras“, Vilnius, *Pseudomonas mendocina* lipazė gauta iš Biochemijos instituto Molekulinės biologijos ir biotechnologijos skyriaus, Vilnius. Kitos lipazės: komerciniai Novozymes preparatai – firmos atstovo Lietuvoje – UAB „Biopolis“ dovana, lipazės, tirtos Lundo universitete (rezultatai aprašyti 3.4 skyriuje) pirktos iš Sigma (St. Louis, MO), išskyrus *Candida antarctica* (Lipozyme® CALB L) dovanota Novozymes (Danija), *Pseudomonas fluorescens*, pirktas iš Aldrich, *Aspergillus niger* (ANL) iš Fluka. Komercinių lipazių aktyvumai, išmatuoti pagal standartinį lipazių aktyvumo nustatymo metodą, pateikti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Lipazių hidroliziniai aktyvumai, naudojant substratą *p*-nitrofenilbutiratą. Numeracija atitinka fermentų numeraciją 3.3.1 skyriuje.

	Imobilizuoti/kieti	U/g <sub>preparato</sub>	Tirpūs	U/ml <sub>preparato</sub>
1	Lipex 100 T	130	11 Lipozyme TL 100 L	17
2	Novozym 435 FG	238	12 Lipex 100 L	77
3	Lipozyme TL IM	11008	13 Palatase 20000 L	10
4	Lipopan 50 BG	968	14 Lipolase 100 L EX	49
5	Lipopan F BG	4670	15 Resinase A2X	86
6	Lipolase 100 T	568	16 Lecitase Ultra	15
7	Lipozyme RM IM	28		
8	Novozym 435	144		
9	Lipoclean 2000 T	2938		
10	Lipoprim 50 T	27841		

**Reagentai.** Tinkami analizei reagentai pirkti iš Sigma ir Chempur (oleino rūgštis, dietilo eteris, acto rūgštis, heksanas). 2-metoksi-2-metilpropanas (MTBE), cikloheksanas, tetradekanas, glicerolis ir oleino rūgštis pirkti iš Merck (Vokietija). Etanolis (Prolabo 95.0 %, 99.5 %) iš VWR. Metanolis, etanolis, 2-propanolis (izopropanolis), petrolio (PE) ir dietilo (DEE) eteriai, n-heksanas, neorganinės rūgštys pirkti iš Lachema Ltd. ir Roth. Tirpikliai, naudoti trioleino etanolizės reakcijoms, džiovinti naudojant molekulinis sietus (porų dydis 3 Å) (Sigma). Trioleinas gautas iš Larodan Fine Chemicals, Malmö, Švedija. Fosfatiniai buferiai ruošti iš atitinkamų natrio druskų (Sigma).

N-metil-N-trimetilsililheptafluorobutiramidas (MSHFBA, Machery-Nagel) pirktas iš ScantecLab. Bredfordo reagentas ir jaučio serumo albuminas pirkti iš Sigma. Glutaro aldehidas ir glicinas pirkti Reanal, Gumarabikas - Chemapol.

Rapsų aliejus, maisto produktas, pagamintas „Obelių rapsų aliejus“. Kiaulių taukai, linų sėmenų aliejus „Anira“ pirkti iš prekybos tinklo „Norfa“.

Plonasluoksnės chromatografijos plokštelės DC-Fertigplatten SIL G-25 UV254 pirktos iš Macherey-Nagel, Vokietija. Kiti reagentai buvo analizinio grynumo, pirkti iš Sigma.

**Nešikliai.** Polipropilenas Accurel MP-1000 pirktas iš Membrana GmbH (Vokietija). Chitinas pirktas iš Reachim, Ligninas gautas iš Latvijos Medienos chemijos instituto. Chitozanas paruoštas iš chitino, magnetiniai chitino 1 (Fe – 9 %), ir 2 (Fe – 21,6 %), chitozano 1 (Fe – 7,1 %), 2 (Fe – 26,5 %) ir lignino nešikliai paruošti Vilniaus universiteto biochemijos ir biofizikos katedroje (V. Bendikienė) [219, 220].

Poliuretano (PU) ir chitozano (CHZ) dariniai buvo paruošti ir ištirti Viliaus universiteto Polimerų chemijos katedroje [221, 222]. Poliuretano mikrodalelės buvo sintetamos iš polivinilo alkoholio ir heksametilendiizocianato. Skiepytojo chitozano (SK-CHZ) nešikliai gauti polietilenglikolio metilo eterio metakrilato makromonomerą skiepijant ant chitozano karkaso, naudojant  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  iniciatorių, tuomet aktyvuoti glutaro aldehidu. Granocell 2000 (GR-2000) ir Granocell 4000 (GR-4000) buvo paruošti Kauno technologijos universitete pagal Lietuvos patentą nr. 2299 [223]. Granocell yra makroporinga celiuliozė (talpinanti iki  $2 \cdot 10^6$  molekulinės masės molekules). Amino grupės prie nešiklio prijungtos veikiant epichlorhidrinui ir pentaetilenheksaminui. Modifikuotas nešiklis aktyvuojamas GA.

## **2.2 Lipazių imobilizavimas**

### **2.2.1 Adsorbcija ant Acurell MP 1000**

Lipazės buvo imobilizuojamos adsorbcijos būdu ant makroporingo polipropileno Accurel MP 1000 (dalelių dydis 200 – 700  $\mu\text{m}$ ), pagal adaptuotą

Hagström metodą [224]. Naudoti skirtingi lipazės miltelių ar tirpalo kiekiai, priklausomai nuo preparato aktyvumo ir jame esančio baltymo kiekio. Vienam gramui Accurel MP1000 buvo panaudota ANL 200 mg, CALB 3.3 ml, *Candida rugosa* lipazės (CRL) 133 mg, PFL 440 mg, RAL 600 mg, RNL 600 mg, RML 1,4 ml ir TLL 1,4 ml. Visais atvejais pradinis lipazės preparatas (kietas ar skystas) ištirpinamas 10 ml natrio fosfatiniame buferyje, skaičiuojant vienam gramui nešiklio (pH 7,0, 50 mM), ir užpilamas ant etanolio sudrėkinto (3 ml/g nešiklio) Accurel MP1000. Nešiklis ir fermento tirpalas inkubuojami ant linguojančio padėklo kambario temperatūroje (20 °C) 3 val., tuomet nufiltruojamas naudojant vakuumą. Tris kartus 5 ml natrio fosfatinio buferiu (pH 7,0, 50 mM) praskalautas preparatas džiovinamas per naktį sumažinto slėgio sąlygomis. Išmatuojamas filtrato ir praplovimų baltymų tirpalų tūris, koncentracija ir aktyvumas, apskaičiuojamos išeišigos.

### **2.2.2 Adsorbicija ant lignino, chitino, chitozano bei magnetinių jų darinių**

Lipazės preparatas, jei reikia, skiedžiamas natrio fosfatinio buferiu (pH 7,0, 50 mM) ir užpilamas 2ml/g ant šiame buferyje išbrinkinto nešiklio. Nešiklis ir fermento tirpalas inkubuojami ant purtyklės kambario temperatūroje 5 val., tuomet 12 val. paliekama šaldytuve. Tolesnė imobilizacijos eiga tokia pati, kaip adsorbuojant ant Accurell MP 1000.

### **2.2.3 Kovalentinė imobilizacija**

Nešikliai aktyvinami glutaro aldehido (GA) pertekliumi (25 – 30 kartų molinis perteklius nešiklio funkcinių grupių skaičiui). GA perteklius atplaunamas pH 7,0 buferiu. Tolesnė imobilizavimo eiga – kaip adsorbicijos atveju.

## **2.3 Baltymų kiekio nustatymas**

Baltymų kiekis buvo nustatomas Bredfordo būdu, pagal standartinę kreivę, gautą naudojant jaučio serumo albuminą [225]. Ant nešiklio imobilizuotas baltymo kiekis nustatytas išmatavus baltymo kiekį tirpale prieš ir po imobilizacijos.



## **2.4 Lipazės aktyvumo nustatymas**

Hidrolizinis lipazės aktyvumas buvo nustatomas spektrofotometrine analize termostatuojamoje kiuvetėje 30 °C temperatūroje, naudojant *p*-NPB substratą ir nepertraukiamai matuojant šviesos sugertį esant 405 nm bangos ilgiui. Taip registruojamas lipazės katalizuojamos *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NPB) hidrolizės produkto - *p*-nitrofenolio – koncentracijos didėjimas. Pradinis 20 mM *p*-NPB tirpalas ruošiamas izopropanolyje, koncentracija matavimo kiuvetėje reakcijos buferyje buvo lygi 0,4 mM. Parenkama tokia fermento koncentracija, kad sugertis didėtų tiesiškai bent dvi minutes. Vienas lipazės hidrolizinio aktyvumo vienetas (U) atitinka fermento kiekį, kuris lemia 1 μmol *p*-nitrofenolio susidarymą per minutę. Ant nešiklo immobilizuotas hidrolizinis aktyvumas nustatomas išmatavus lipazės aktyvumą tirpale prieš ir po adsorbcijos.

Nustatant hidrolizinio aktyvumo priklausomybę nuo pH, temperatūrinį optimumą ir termostabilumą naudotas 0,1 M universalus buferis (UB) (Britton-Robinson buferis), sudarytas iš acto, orto-boro ir orto-fosforo rūgščių moliniu santykiu 1:1:1. Šis buferis tinkamas naudoti plačiame pH intervale (2-12) [226, 227]. Reikalingas pH pasiekiamas buferį titruojant NaOH.

Nustatant hidrolizinio aktyvumo priklausomybę nuo RR ilgio, reakcija vykdoma emulsinimo buferyje (0,1 % gumiarabiko, 0,2 % natrio deoksicholato pH 8,0 UB). Substratai ruošiami tirpinant įvairių riebalų rūgščių *p*-NP esterius izopropanolyje (koncentracija 3 mM). *p*-NP RR esterių galutinė koncentracija r-jos mišinyje – 0,3 mM.

## **2.5 Trioleino hidrolizė ir peresterinimas metanoliu heksane**

TO hidrolizė. Reakcija buvo vykdoma 2 ml Eppendorf® plastikiniuose mėgintuvėliuose. Reakcijos mišinį sudarė 10 % (V/V) TO tirpalo heksane, kurio tūris 400 μl. Mišinys buvo inkubuojamas reakcijos temperatūroje 10 min, tuomet pridedama 50 μl lipazės tirpalo vandenyje (atitinkančio 0,01 kU). Naudoti fermentai ir jų specifikacijose aprašyti aktyvumai: Palatase (0,2 kU/g),

Lecitase ultra 10 (kU/g), Lipopan 50 BG (50 kU/g), Lipopan F BG (25 kU/g). Reakcijos mišinys buvo laikomas Biosan Thermoshaker (TS-100) termopurtyklėje nurodytoje temperatūroje, esant pastoviam 1400 rpm purtymui. Reakcija stabdoma pridėdant 450 µl DEE ir užšaldant mėginius -20 °C temperatūroje. Analizė buvo atliekama plonasluoksnės chromatografijos ir densitometrijos metodu, kaip aprašyta žemiau.

TO peresterinimas metanolio buvo vykdomas tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir hidrolizė, tik į reakcijos mišinį buvo dedama metanolio (MeOH), moliniu alkoholio ir triacilglicerolio santykiu 4:1.

## **2.6 Fermentinė biodyzelino sintezė be tirpiklio**

Reakcija buvo vykdoma 2 ml Eppendorf® plasikiniuose mėgintuvėliuose. Reakcijos mišinio suminis tūris buvo 1 ml, sudarytas iš riebalų ar riebalų mišinio, etanolio (etanolio:triacilglicerolių moliniu santykiu 3:1) ir 4 % (m/v arba v/v) lipazės. Reakcijos mišinys buvo laikomas Biosan Thermoshaker (TS-100) termopurtyklėje 35 °C temperatūroje, esant pastoviam 1400 rpm purtymui. Reakcijos mišinio mėginiai imami tam tikrais laiko tarpais, po 50 µl, prieš tai gerai supurčius. Reakcija stabdoma į mėginius pilant 50 µl dietilo eterio ir juos užšaldant. Fermentų atranka buvo vykdoma tomis pačiomis sąlygomis 3 val. Analizė buvo atliekama plonasluoksnės chromatografijos ir densitometrijos pagalba, kaip aprašyta žemiau.

## **2.7 Etanolizė – reakcijos priedų įtaka**

Trioleino etanolizė standartiniu atveju buvo vykdoma 4,5 ml stikliniuose mėgintuvėliuose užsukamais dangteliais su membrana. Reakcijos mišinio suminis tūris buvo 2 ml, jį sudarė 150 mM trioleino ir 600 mM etanolio tirpalas metilo-*tert*-butilo eteryje. Monooleino alkoholizės atveju monooleino koncentracija buvo 50 mM, etanolio 200 mM. Reakcija pradėdama pridėdant 2 % (m/v reakcijos tūriui) imobilizuoto lipazės preparato. Priedų (Silikagelio 60, Amberlite IR (H), Amberlite IR (Na) (gautas natrio šarmu neutralizavus Amberlite IR (H)) ir vandens) įtaka acilgrupės migracijai buvo tiriama

pridedant 2 % m/v minėtų priedų. Ar Accurel MP 1000 neturi įtakos reakcijai, patikrinta dedant papildomai 2 % šio nešiklio. Vandens įtaka buvo tiriama pridedant MilliQ grynumo vandens kiekį, atitinkantį tam tikrą termodinaminį vandens aktyvumą MTBE, pagal standartinę kreivę, sukalibruotą pagal prisotintus druskų tirpalus.

Reakcijos mėginiai, jei neparašyta kitaip, buvo inkubuojami termopurtyklėje 600 rpm 30 °C 48 valandas. Mėginiai buvo imami per membraną su Hamiltono švirkštu. Mėginiai analizuojami dujų chromatografijos būdu, kaip aprašyta žemiau. Eksperimento ir analizės vidutinis standartinis nuokrypis išmatuotas atskirų eksperimentų seka ir yra lygus 4 % įverčio.

Vykiant etanolizės reakcijas be tirpiklio, jei tekste nenurodoma kitaip, naudotas toks pats alkoholio:triacilglicerolio santykis, kaip ir reakcijoms MTBE, fermento kiekis – 4 % (m/v).

## **2.8 Monoacilglicerolių sintezė**

### **2.8.1 2-Monooleino sintezė**

2-monooleinas buvo sintetinamas vykiant trioleino etanolizę ir naudojant 1,3-specifinę lipazę Millquist aprašytu adaptuotu metodu [129]. Etanolis (600 mM) ir trioleinas (150 mM) buvo ištirpinti MTBE, į reakcijos mišinį papildomai pridėta vandens (0,5 %). Reakcijai katalizuoti į mišinį dėta imobilizuoto RAL preparato (2 % m/v skaičiuojant visam reakcijos tūriui), kolba perkeliama į purtyklę ir purtoma 8 val. 30 °C 160 rpm greičiu. Mėginiai dujų chromatografijai imami periodiškai, norint stebėti reakcijos eigą. Produktas gryninamas kaip aprašyta 1-monooleino sintezės skiltyje, tik praleidžiamas tirpalo n-heptane centrifugavimo etapas, ir kristalizuojamas iš n-heptano -20 °C.

### **2.8.2 1-Monooleino sintezė**

1-monooleinas buvo sintetinamas esterinant oleino rūgštį glicerolio pertekliumi, naudojant 1,3-specifinę lipazę (RAL). Oleino rūgštį (0,1 M) ir glicerolį (0,5 M) ištirpinus *t*-butanolyje dedama 2 % m/v imobilizuoto RAL preparato, kolba purtoma 6-7 val. 30 °C 160 rpm greičiu. Periodiškai imami mėginiai GC analizei. Tirpiklis pašalinamas rotorinio vakuuminio išgarinimo būdu, likutis ištirpinamas *n*-heptane (30-35 ml heptano /g oleino rūgšties) ir, norint pašalinti glicerolio perteklių bei reakcijos metu susidariusį vandenį, centrifuguojamas 3200 rpm. Supernatantas, kuriame ištirpęs 1-monooleinas, inkubuojamas -20 °C 8 val., susidarę 1-monooleino kristalai atskiriami vakuuminio filtravimo būdu. Išgrynintas 1-monooleinas (>98 % pagal GC) laikomas -20 °C.

### **2.9 Fenetilo esterių sintezė**

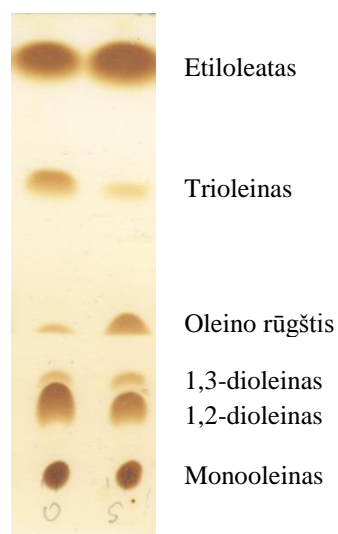
Fenetilo esterių sintezė buvo vykdoma 2 ml Eppendorf® plasikiniuose mėgintuvėliuose, atliekant bent po du pakartojimus, reakcijos mišinio bendras tūris buvo 1 ml. Jei nenurodyta kitaip, naudota 1 M ekvimoliarinė pradinė alkoholio ir RR koncentracija, (triacilglicerolių koncentracija atitinkamai 0,33 M). Reakcija pradedama į iš anksto pašildytą substratų tirpalą heksane arba *tret*-butanolyje pridedant fermento. Fermento koncentracija atrankos reakcijose buvo 5 % v/v arba m/v, 4,2 % kitų reakcijų atveju, jei neparasyta kitaip. Mėginiai ir kontrolės buvo inkubuojami Biosan Thermoshaker (TS-100) purtyklėje nurodytoje temperatūroje 1400 rpm. Reakcijos mišinio mėginiai imami tam tikrais laiko tarpais, po 50 µl, prieš tai gerai supurčius. Reakcija stabdoma į mėginius pilant 50 µl dietilo eterio ir juos užšaldant. Analizė buvo atliekama plonasluoksnės chromatografijos ir densitometrijos pagalba, kaip aprašyta žemiau.

### **2.10 Plonasluoksnė chromatografija ir densitometrija**

Reakcijos produktų analizė buvo vykdoma ant 0,25 mm sluoksniu silikageliu 60 UV<sub>254</sub> padengtų plonasluoksnės chromatografijos (TLC)

plokštelių (5x10cm and 10x10cm). Naudojant 5µl Hamiltono švirkštą mėginiai 2µl tūriais buvo užnešami ant plokštelės 10 mm atstumu vienas nuo kito ir nuo apatinio krašto. Išdžiovinta plokštelė buvo merkiama į mobilią fazę petrolio eteris: dietilo eteris: acto rūgštis (85:15:2) v/v arba (80:20:1), taip, kad mobili fazė apsemtų iki 3 mm plokštelės apatinio krašto.

Mobiliai fazei pakilus iki numatyto taško, plokštelė išimama ir džiovinama 10–15 min, tuomet ryškinama, arba, jei junginiai absorbuoja UV srityje, iš karto fotografuojama apšvietus 254 nm bangos ilgio šviesa. Nesočiųjų riebalų rūgščių turinčių junginių (aliejų ir jų produktų) TLC plokštelės buvo ryškinamos jodo garų kameroje, kiti lipidai buvo dažomi apipurškiant plokšteles 0,2 % 2,7-dichloroflouresceino tirpalu 2-propanolyje ir džiovinant ant 40 °C paviršiaus 30 minučių. Jodu dažytos plokštelės pavyzdys pateiktas 2.1 pav.

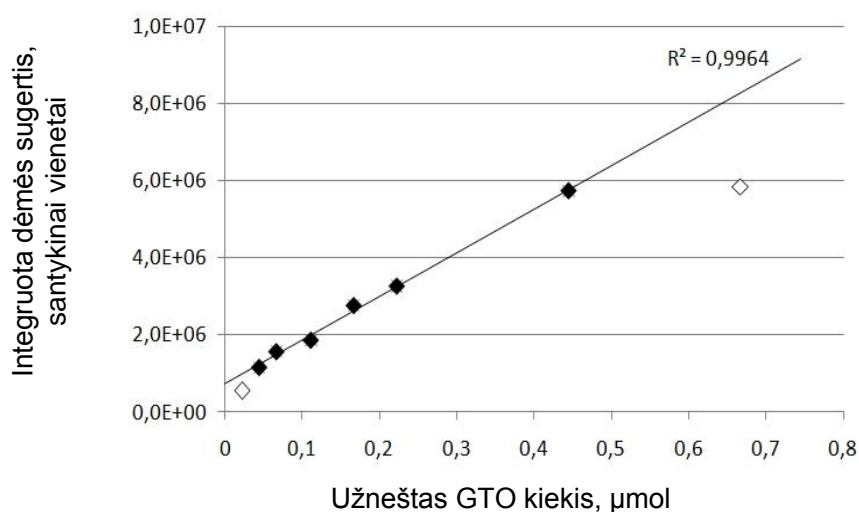


2.1 pav. Biodyzelino sintezės metu susidarančių produktų chromatografinis atvaizdas. Mobili fazė PE:DEE:AR 80:20:1.

Kiekybinė TLC atskirtų reakcijos produktų analizė buvo atliekama densitometrijos principais UVItec Cambridge Fire-reader vaizdo kamera ir UVItec Fire-reader 15.10 vaizdo apdorojimo programa. Integruota dėmės sugertis apskaičiuota atsižvelgiant į dėmės plotą ir spalvos intensyvumą kiekviename paveikslėlio elemente, atmetant foninę sugertį.

Koncentracijos skaičiavimai pagrįsti kiekvieno junginio specifinės sugerties standartinėmis kreivėmis, tiesiniame intervale. Standartinės kreivės pavyzdys (gliceriltrioktanoato (TK) dėmės sugerties priklausomybė nuo užnešto medžiagos kiekio) pateiktas 2.2 pav. Šiuo atveju tiesinis intervalas

yra 0,044–0,44  $\mu\text{mol}$  TK, kas atitinka 0,07–0,67 M TK koncentraciją reakcijos mišinyje.



2.2 pav. Standartinė TK densitometrijos kreivė, integruoto dėmės ploto sugerties priklausomybė nuo užnešto medžiagos kiekio. Tiesinį intervalą sudaro taškai, pažymėti juodai.

Santykinė reakcijos komponentų koncentracija tam tikru reakcijos momentu yra išreiškiama riebalų rūgšties ekvivalentais % (t.y. visos riebalų rūgšties liekanos, esančios reakcijos mėginyje, sudaro 100 %, kiekvieno junginio procentinė koncentracija reiškia, kad tam tikra dalis riebalų rūgšties liekanų yra šio junginio sudėtyje).

### 2.11 Dujų chromatografijos analizė

Metodo esmė: visi junginiai, turintys hidroksilgrupę yra sililunami, naudojant MSHFBA ir skiedžiami cikloheksanu, kuriame ištirpintas vidinis standartas. Junginių atskyrimas remiasi skirtingu jų lakumu, išnešti junginiai aptinkami liepsnos jonizaciniu detektoriumi (FID).

Oleilglicerolių etanolizės mėginiai, kuriuose yra etiloleato, oleino rūgšties, 1-monooleino, 2-monooleino, 1,2-dioleino, 1,3-dioleino ir triooleino buvo analizuojami dujų chromatografijos būdu naudojant Varian dujų chromatografą (430-GC-FID, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) su liepsnos jonizaciniu detektoriumi ir FactorFour™ kapiliarine kolonėle (VF = 1 ms, ilgis 15 m, vidinis skersmuo 250  $\mu\text{m}$ , Varian, Agilent Technologies Inc.,

Santa Clara, CA). Nešančios dujos buvo helis (20 psi), injektoriaus ir detektoriaus temperatūra buvo 350 °C. Pradinė (180 °C) kolonėlės temperatūra buvo palaikoma 2,5 min, tuomet 10 °C/min greičiu pakeliama iki 340 °C ir palaikoma 26 minutes.

Reakcijos mišinio mėginiai buvo sililunami pridėdant tokį patį kaip mėginio MSHFBA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-heksafluorobutiramido) tūrį ir laikant juos kambario temperatūroje bent 30 minučių. Reakcijų, vykusių be tirpiklio, atveju ir reakcijų, kuriuose tirpiklis buvo *t*-butanolis, mėginiai prieš sililinimą buvo skiedžiami MTBE atitinkamai 10 ir 5 kartus. Sililinimas užbaigiamas pridėdant 99,5 % etanolio tūrį, lygų naudotam MSHFBA tūriui. Mėginiai skiedžiami 15 kartų vidinio standarto tetradekano tirpalu cikloheksane, gaunamas mėginys, kuriame tetradekano koncentracija yra 8 mM, jis analizuojamas dujų chromatografu. Pavyzdinė chromatograma pateikta 2.3 pav.

Medžiagų koncentracijos skaičiuojamos pagal santykinį piko plotą (vidinio standarto atžvilgiu) naudojant santykinius molinius atsako koeficientus (RMRF), apskaičiuotis pagal teorinius santykinius molinius atsakus (r.m.r.) arba naudojant standartines kreives (trioleino atveju) (2.2 lentelė) [228, 229].

2.2 lentelė. Junginių, tirtų dujų chromatografijos metodu, užlaikymas ir santykiniai moliniai atsako koeficientai (RMRF)

Junginys	Užlaikymas, min	RMRF
Glicerolis*	0,57	0,7821
Tetradekanas	0,71	1
Nesililinta oleino rūgštis	4,69	1,214
Etiloleatas	4,93	1,3571
Oleino rūgštis	5,43	1,4214
Nesililintas monooleinas	9,00	1,357
2-monooleinas	9,60	1,8143
1-monooleinas	9,85	1,8034
1,2-dioleinas	18,28	2,8357

1,3-dioleinas	18,46	2,825
Nesililintas dioleinas	18,63	2,607
Trioleinas	41,61	3,857**

\* glicerolio koncentracija nevertinta dėl jo riboto tirpumo naudotuose tirpikliuose

\*\* trioleino RMRF apskaičiuotas pagal standartinę kreivę ir naudota vertė 2,3

Santykinis molinis atsako koeficientas (*RMRF*) apibrėžiamas kaip vertė, apibūdinanti pikų plotų priklausomybės nuo koncentracijos standartinių kreivių santykį.

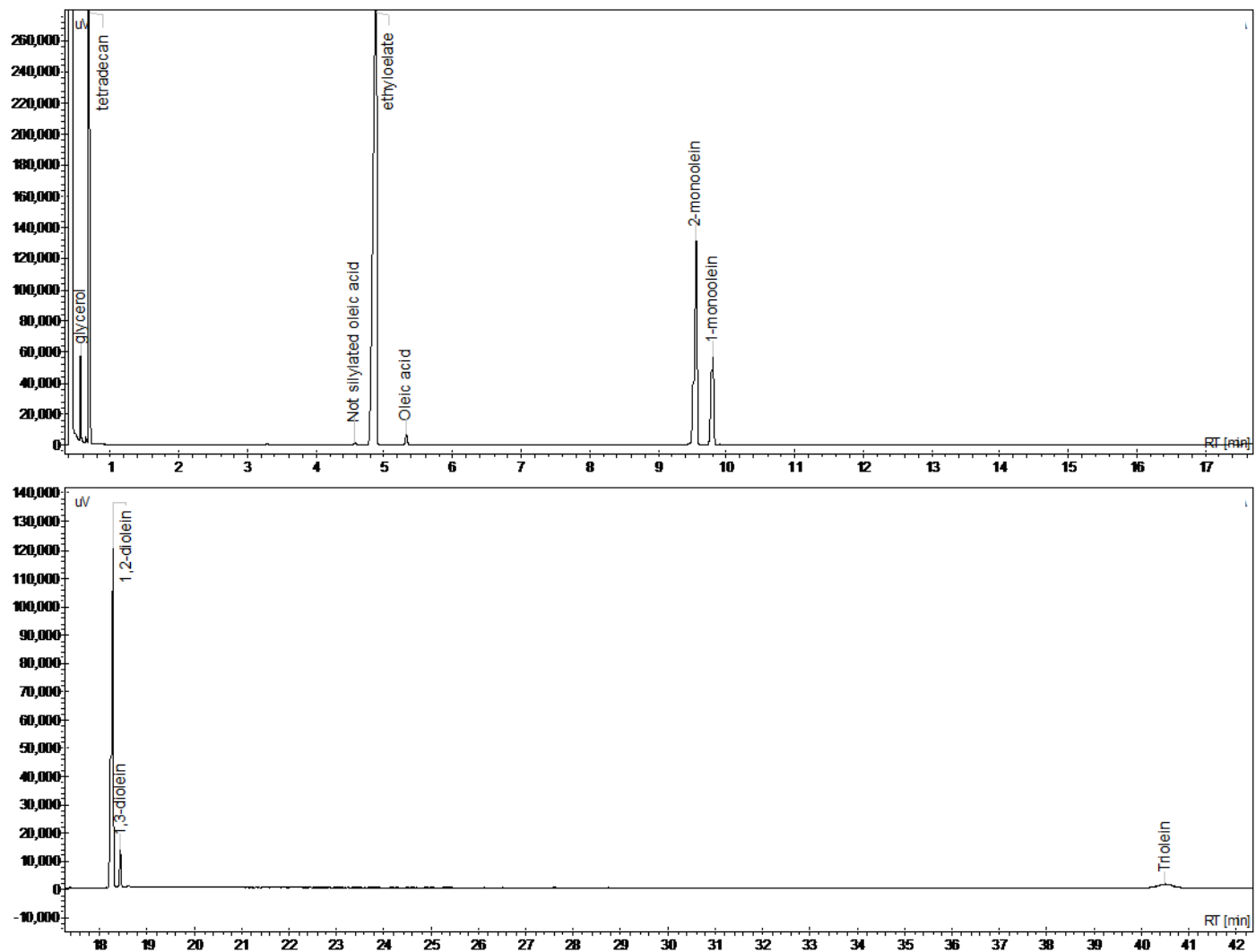
$$RMRF_{junginio} = \frac{r.m.r.(junginio)}{r.m.r.(tetradekano)} ; \quad (2.1 \text{ lygtis})$$

*r.m.r* – santykinis molinis atsakas.

Santykinė reakcijos komponentų koncentracija tam tikru reakcijos momentu yra išreiškiama oleino rūgšties ekvivalentais % (t.y. visos oleino rūgšties liekanos, esančios reakcijos mėginyje, sudaro 100 %, kiekvieno junginio procentinė koncentracija reiškia, kad tam tikra dalis oleino rūgšties liekanų yra šio junginio sudėtyje).

Pradinis reakcijos greitis apskaičiuotas kaip substrato sunaudojimo greitis imobilizuoto ant nešiklio baltymo svorio vienetui ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) per pirmą reakcijos valandą. Kiekvieno junginio koncentracija buvo skaičiuojama kaip oleino rūgšties ekvivalentų, buvusių reakcijos mišinyje prieš jai prasidedant, dalis (%), turint omenyje, kad diacilgliceroliai ir triacilgliceroliai atitinkamai turi po dvi ir po tris riebalų rūgšties liekanas.

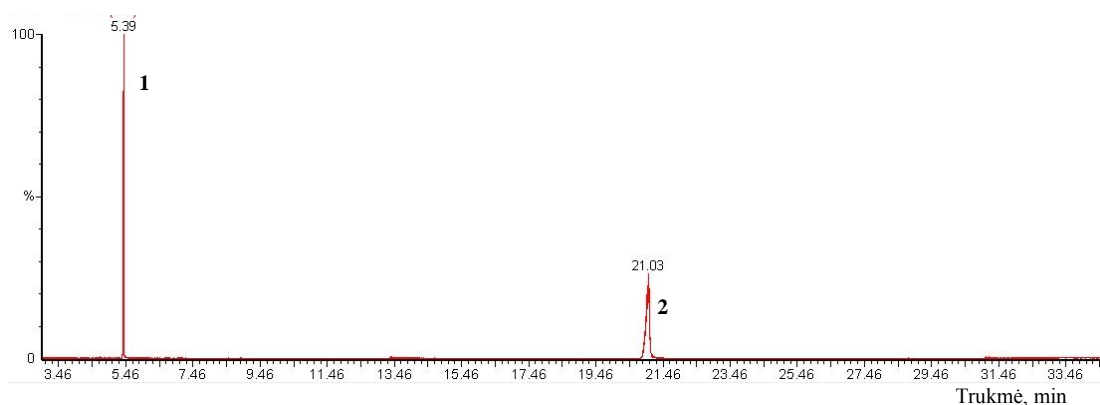




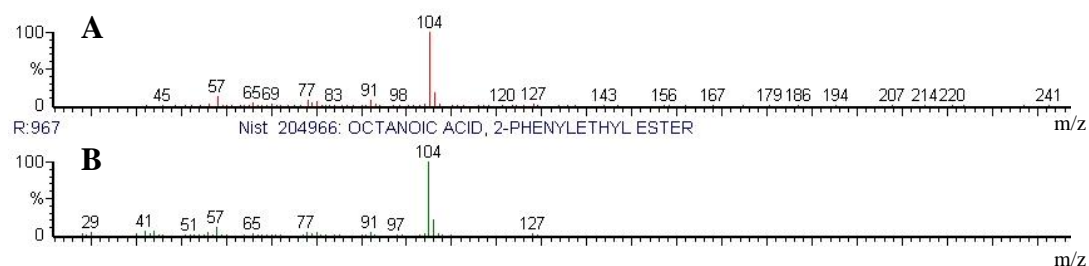
2.3 pav. Tipinė oleino rūgšties ir jos glicerolio esterių dujų chromatograma. Junginių užlaikymas (RT, min) pateiktas 2.2 lentelėje.

## 2.12 Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos analizė

Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos (GC-MS) analizė buvo atliekama Perkin-Elmer dujų chromatografu - masių spektrometru reakcijos produktui - fenetilkaprilatui identifikuoti. Nešančios dujos buvo vandenilis, detektoriaus temperatūra buvo 350 °C. Pradinė (50 °C) kolonėlės temperatūra buvo palaikoma 3,5 min, tuomet 10 °C/min greičiu pakeliama iki 310 °C ir palaikoma 5 minutes. Suminėje jonų chromatogramoje (2.4 pav.) pirmasis pikas yra feniletanolio (vieno iš reakcijos substratų), antrasis pikas yra fenetilkaprilato, jo masių spektras pavaizduotas 2.5 pav. (A) ir palygintas su NIST bibliotekos feniloktanoato masių spektru (B). Registruojamas 96,7 % sutapimas.



2.4 pav. Fenetilkaprilato sintezės suminė jonų chromatograma. Pikai: 1- feniletanolio, 2- fenetilkaprilato.



2.5 Fenetilkaprilato (2 pikas 2.4 pav.) masių spektras (A) – mėginio pikas, B – Nist duomenų bibliotekos pikas.

## 2.13 Atsako paviršiaus metodologija

Eksperimentai buvo planuojami ir rezultatai analizuojami atsako paviršiaus metodologijos (APM) įrankį turinčia Design Expert 8.01 (Stat-Ease,

Minneapolis) programa. Šiuos analizės procesus galima išskirti į tris etapus: 1) eksperimento plano sudarymas ir įvertinimas, 2) modelio, atitinkančio eksperimentinius rezultatus sudarymas ir įvertinimas, 3) optimizavimas. Šios skiltys aprašytos žemiau.

### **2.13.1 Eksperimento plano sudarymas ir įvertinimas**

Eksperimento planas yra sukuriamas pagal vieną iš numatytų standartinių statistiškai pagrįstų planų.

Centrinis kompozicinis eksperimento (CCD) planas yra populiariausias iš APM naudojamų planų. CCD sudaro trijų tipų eksperimento plano taškai: dviejų lygių faktoriai ar trupmeniniai faktoriai, ašiniai ir centriniai taškai. Trupmeninis faktoriai eksperimento planas naudotas TO hidrolizės ir peresterinimo reakcijoms tirti, buvo sudarytas iš keturių faktorių taškų, keturių ašinių taškų ir penkių centrinių taškų. Penkių lygmenų CCD planą, sudarė 52 eksperimentiniai bandymai. Ašiniai taškai nutolę nuo centrinio taško atstumu  $\alpha$ , kurio vertė pasirinkta kaip praktinė (1,18921).

D-optimalaus eksperimento plano taškai parenkami matematiškai taip, kad variacija, susijusi su apibūdintų modelio koeficientų įverčiais, būtų minimali. Dauguma plano taškų yra plano erdvės kraštuose, be to, šis planas geras tuo, kad galima įvesti eksperimento plano numatomų taškų apribojimus, pridėti papildomų taškų. Šis planas naudotas peresterinimo reakcijoms be tirpiklio tirti (3.3.2 skyrius). Eksperimento planą sudarė 25 eksperimentiniai bandymai, iš kurių 15 buvo modelio taškai, 5 taškai, skirti neatitikimui išmatuoti ir 5 pakartojimai. Taškai buvo parenkami iš vertikalių ašių, kampų centrų, apribojančių plokštumų centroidų, ašinių patikrinimo taškų, vidinių taškų ir viso centroido.

Kiekvienas planas gali būti keičiamas (pridedami ar ištrinami eksperimentiniai taškai, keičiamos nepriklausomų kintamųjų vertės), tačiau jis turi būti įvertintas, kad būtų užtikrintas atsaką lemiančių veiksnių išmatavimas. Modelio vertinimo etape apskaičiuojami modelio ir paklaidų laisvės laipsniai,

koeficientų standartinės paklaidos, dispersijos infliacijos faktorius (VIF),  $R_i^2$ , įtakos indeksai (leverage), grafiškai pateikiamas modelio standartinės paklaidos grafikas nepriklausomų kintamųjų intervale.

### 2.13.2 Modelio, atitinkančio eksperimentinius rezultatus sudarymas ir įvertinimas

Atlikus eksperimento plane numatytus eksperimentus, rezultatai analizuojami, taikomas geriausiai rezultatus atitinkantis modelis. Šią analizę sudaro keli etapai: funkcijos transformacijos pasirinkimas, modelio atitikimo patikrinimas (regresijos apskaičiavimas pritaikant atsako vertėms visus polinominius modelius, modelių palyginimui apskaičiuojamos F-vertės, neatitikimas,  $R^2$ , pasiūlomas statistiškai reikšmingas modelis), modelio pasirinkimas (linijinis, dviejų funkcijų sąveikos ar polinominis), vykdoma dispersijos analizė (ANOVA).

Modelio ir atskirų dedamųjų reikšmingumas aprašomas F-verte (dedamosios ar modelio dispersija lyginama su paklaidos dispersija, jei dispersijos panašios, F vertė artima vienetui, tai mažai tikėtina kad veiksnys (veiksniai) turi reikšmingą įtaką atsakui), p verte ( $P > F$ ) (laikoma reikšminga, jei  $p (P > F) < 0,05$ ), neatitikimo indeksu, signalo ir triukšmo santykiu.

Norint įvertinti modelio atitikimą eksperimentinėms vertėms ir aptikti eksperimento klaidas (vertes, iškrentančias iš konteksto), naudojamas Design Expert programos diagnostikos įrankis, kurį sudaro dvi dalys: **diagnostikos ir įtakos**. **Diagnostikos** dalyje remiantis statistinių funkcijų grafikais tikrinama, ar modelis gerai atitinka eksperimentinius duomenis: 1) ar paklaidos (skirtumas tarp eksperimentinės vertės ir modelio prognozuojamos vertės) barstosi pagal normalųjį skirstinį, 2) kaip ir ar atsitiktinai išsibarstę (nedidėja) paklaidos, didėjant prognozuojamoms atsako vertėms 3) kaip ir ar atsitiktinai išsibarstę paklaidos priklausomai nuo eksperimentinių mėginių eiliškumo 4) ar eksperimentinių atsako verčių priklausomybė nuo modelio

prognozuojamų atsako verčių vientisai išsibarsto palei 45 laipsnių liniją, 5) ar nereikalinga funkcijos transformacija, remiantis Box Cox grafiku, 6) kaip išsibarstę paklaidos, priklausomai nuo kiekvieno iš nepriklausomų kintamųjų.

**Įtakos** dalyje tikrinama kiekvieno individualaus eksperimentinio rezultato įtaka modeliui, taip aptinkamos eksperimento klaidos, stebimi didžiausią įtaką modeliui darantys eksperimentiniai rezultatai 1) išoriškai studentizuotų paklaidų grafike stebima, keliomis standartinio nuokrypio vertėmis išmatuota vertė skiriasi nuo prognozuojamos vertės, gautos ištrynus tą tašką iš modelio (studentizuota paklaida – koeficientas, gautas padalinus paklaidą iš jos standartinio nuokrypio įvertinio reikšmės), 2) įtakos indeksas: įvertinama, kaip kiekvienas taškas veikia modelio atitikimą (jei taško poveikis lygus vienam, šio taško rezultatas kontroliuoja modelį ir modelis privalo eiti per šį tašką, tokiu atveju poveikis turi būti sumažinamas pakartojant ar papildomai pridėdant eksperimentinių taškų) 3) DFFITS diagnostika apibūdina, kiek kiekvienas taškas įtakoja modeliu prognozuojamą vertę; tai dydis, panašus į išoriškai studentizuotą paklaidą (tik padaugintas iš koeficiento, kurio vertę lemia įtakos indeksas) 4) DFBETAS išmatuojama kiekvieno taško įtaka regresijos koeficientui, statistiniu požiūriu panaši į DFFITS, tačiau matuojama išskaidyta įtaka kiekvienam modelio lygties koeficientui 5) Cook atstumas – matas, kaip pasikeistų regresinės analizės vertės, jei tiriamas taškas būtų neįtrauktas į analizę.

Atsižvelgiant į diagnostikos rezultatus sudaromas modelis. Jeigu aptinkamos eksperimento klaidos, jos pašalinamos iš modelio, taip pat pašalinami nereikšmingi kintamieji, jei be jų modelis geriau aprašo eksperimentinius duomenis.

Kvadratinis polinominis regresijos modelis skirtas atsakui(-ams)  $Y$  prognozuoti aprašomas šia funkcija (2.2 lygtis):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

2.2 lygtis

Čia  $Y$  yra atsakas (priklausomas kintamasis), o  $X_i$  ir  $X_j$  nepriklausomi kintamieji.  $\beta_0$ ,  $\beta_i$  ir  $\beta_j$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  yra pastovūs koeficientai (tiesinės, kvadratinės ir sąveikos dedamųjų).

### 2.13.3 Optimizavimas

Parinkus eksperimentines vertes atitinkantį modelį, galima rasti tokias nepriklausomų kintamųjų vertes, kurios lemtų pageidaujamą atsako vertę. Tai vadinama optimizavimu. Design expert programa apjungia tikslus į vieną siekiamybės funkciją, programa siekia maksimizuoti šią funkciją. Naudotas skaitinio optimizavimo būdas, kurio metu galima pasirinkti pageidautiną tikslą: pasiekti minimalią, maksimalią ar tam tikrą norimą atsako bei kintamųjų vertę nustatytame ar visame modeliu aprašomame nepriklausomų kintamųjų intervale. Kiekvienam iš pasirinktų tikslų gali būti suteikiamas tam tikras svoris (0,1–10) vienetas nurodo linijinę funkciją, didesnės už vienetą vertės slenka rezultata link numatytos tikslinės vertės, mažesnės – atvirkščiai), be to, kiekvienam tikslui gali būti suteikiama santykinė svarba (nuo vieno iki penkių).

## 3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 3.1 *Enterobacter aerogenes* lipazės imobilizacija ir savybės

Šio tyrimų etapo tikslas buvo ištirti tirpios ir imobilizuotos *Enterobacter aerogenes-13* lipazės (UAB „Biocentras“) savybes. Šis bakterijų kamienas įmonėje buvo atrinktas dėl savo savybės hidrolizuoti lipidus, tyrimai buvo atlikti, norint sukurti mokslinių žinių bazę pigiam ir efektyvumam lipazės pramoniniam pritaikymui.

*Enterobacter aerogenes* lipazės preparatai BMBK buvo imobilizuoti ant skirtingų nešiklių: grynų lignino, chitino (CHT), chitozano (CHZ), poliuretaninių (PU) nešiklių ir įmagnetintų magnetitu  $Fe_3O_4$  lignino, chitino (m-CHT) ir chitozano (m-CHZ). Chitinas yra poli-(N-acetilgliukozaminas), o chitozanas – įvairiu laipsniu deacilintas jo darinys. Chitozanas turi amino- ir

hidroksilo- grupes, kurios gali būti chemiškai modifikuojamos, jis tirpus rūgštiniuose tirpaluose, neutralizavus išsikristalيزuoja, tokiu būdu galima gauti norimo dydžio ir savybių nešiklio daleles [230]. Ligninas yra heterogeninis polimeras, sudarytas iš trijų skirtingų metoksilintų monolignolio monomerų. Šios žaliavos natūralios, jų gamtoje daug, todėl komerciniu būdu nešikliai gali būti pigiai paruošiami.

### 3.1.1 Adsorbicija ant lignino, chitino, chitozano bei jų magnetinių darinių

Adsorbicija ant lignino – imobilizuota 55 % aktyvumo ir 20 % baltymo, tačiau preparato savitasis aktyvumas sumažėja daugiau nei dvidešimt kartų (aktyvumas  $0,17 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (3.1 lentelė), todėl tirtomis sąlygomis *Enterobacter aerogenes* lipazės imobilizacija ant gryno lignino nėra efektyvi.

Adsorbicija ant chitino. Lipazė buvo imobilizuota ant gryno CHT bei m-CHT, kuriuose geležis sudarė 9,0 % ir 21,6 %. Didžiausiu aktyvumu pasižymėjo *Enterobacter aerogenes* lipazė adsorbicijos būdu imobilizuota ant magnetinio chitino turinčio 21,6 % geležies: preparato aktyvumas - 2,91 U/g. Imobilizuota aktyvumo dalis beveik du kartus didesnė, nei imobilizuota baltymo dalis. Taigi šiuo atveju lipazė atrankiau nei kiti preparate esantys baltymai nusėda ant nešiklio, todėl imobilizacijos procesas taip pat yra ir dalinis fermento gryninimas.

3.1 lentelė. Adsorbicijos būdu ant lignino, chitino ir chitozano nešiklių imobilizuotos *Enterobacter aerogenes* lipazės preparatų aktyvumas

Nešiklis	Imagnetinimo laipsnis, % Fe	Imobilizuoto preparato aktyvumas, U/g	Imobilizuota aktyvumo dalis, %	Savitasis imobilizuoto baltymo aktyvumas, U/mg	Imobilizuota baltymo dalis, %	Imobilizuotas baltymo kiekis, mg/g <sub>nešiklio</sub>
Ligninas	-	0,17	55	0,02	20	7,5
CHT	-	2,05	35,3	1,57	29,4	1,3
m-CHT	9	2,28	46	1,25	40,7	1,83
m-CHT	21,6	2,91	58,7	1,93	33,5	1,51
CHZ	-	1,45	<1	2,90	11,1	0,5
m-CHZ	7,1 %	1,08	<1	2,76	14,4	0,65
m-CHZ	27,5 %	0,98	<1	2,18	0,1	0,45

Imobilizuojant *Enterobacter aerogenes* lipazę ant gryno CHZ ir m-CHZ, skirtingai nei prieš tai vykdytą imobilizaciją ant chitino darinių atveju, atplautas beveik visas imobilizavimui naudotas aktyvumas (3.1 lentelė). Tačiau imobilizuotų lipazės preparatų aktyvumas buvo sąlyginai didelis: 0,98–1,45 U/g, palyginus, tik 2 kartus mažesnis, nei ant chitino imobilizuoto fermento (2,1–2,9 U/g). Taigi, panašu, kad imobilizuojant stebima lipazės aktyvacija. Lipazių aktyvacija imobilizuojant yra gana dažnas reiškinys [21, 208, 231]. Gali būti, kad dėl nešiklio savybių imobilizuojamas fermentas arba yra aktyvioje konformacijoje (atviru dangteliu), arba aktyviu centru pasuktas į tirpalo pusę ir todėl padidėja jo lipolizinis aktyvumas.

Lipazes dažnai aktyvuoja įvairūs detergentai, ypač monosacharidų ir RR esteriai [232]. Norint įsitikinti, kad aktyvacija lemiamą fermento ir nešiklio sąveikos, o ne šalutinės nuo nešiklio atsplovusių junginių sąveikos ar nespecifinės *p*-NPB hidrolizės, buvo iširta lipazės sąveika su chitino ir chitozano monomerais ( $10^{-2}$  M N-acetilgliukozamino ir gliukozamino tirpalais), tačiau reikšmingo lipazinio aktyvumo pokyčio nepastebėta. Be to, buvo iširta ir galima substrato sąveika su nešikliais ar jų irimo produktų buvimas tirpale, tačiau nei atsiplaukiančių junginių, nei nefermentinio *p*-NPB skaldymo nepastebėta. Todėl galime teigti, kad padidėjęs fermentinis aktyvumas lemiamas būtent fermento sąveikos su polimeriniu nešikliu.

Adsorbuojant lipazės preparatus ant chitino, imobilizuoto preparato aktyvumas didėja, didėjant Fe kiekiui nešiklyje. Naudojant chitozaną pastebima priešinga priklausomybė: didžiausias imobilizuoto baltymo aktyvumas stebimas jį adsorbavus ant gryno chitozano (3.1 lentelė).

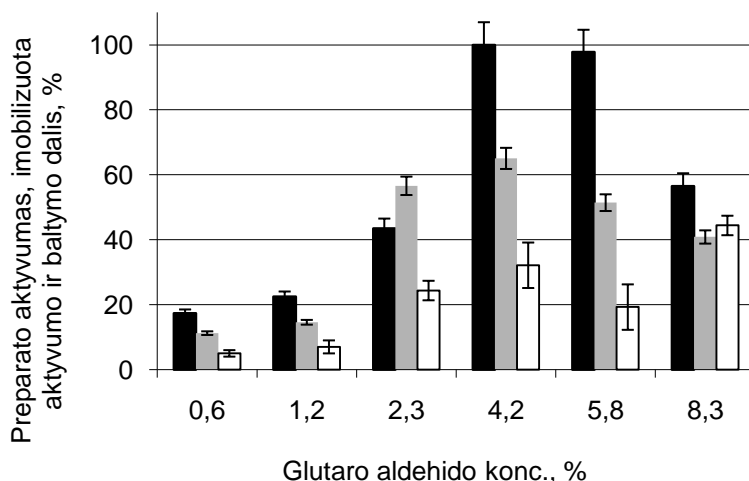


### **3.1.2 Kovalentinė imobilizacija ant magnetinio lignino, chitino ir chitozano bei polimerinių darinių**

#### **3.1.2.1 Kovalentinis imobilizavimas ant magnetinio lignino, naudojant glutaro aldehidą.**

Kovalentinės fermento imobilizacijos atveju svarbu nustatyti optimalią nešiklį aktyvuojančios medžiagos koncentraciją. Pvz., aktyvuojant nešiklį, turintį daug laisvų  $\text{NH}_2$  grupių bifunkciniu glutaro aldehidu (GA), gali atsirasti didesnis nei optimalus aldehido grupių skaičius, todėl gali vykti multitaškinis fermento prisiuvimas, fermentas gali būti prijungtas sluoksniais. Dėl šių priežasčių gali atsirasti sferiniai trukdžiai fermento–substrato sąveikai ar būti pažeidžiama aktyviojo centro struktūra bei aktyvumą lemiančių aminorūgščių labilumas [58, 233].

Lipazės imobilizacijos efektyvumo tyrimams nešiklių aktyvinimui naudotas 0,6 – 8,3 % GA koncentracijų intervalas, didžiausias imobilizuotos lipazės preparato aktyvumas pasiekiamas 4,2 – 5,8 % GA koncentracijų ribose (3.1 pav.). 4,2 % GA aktyvuotas ir 32 % baltymo prisijungęs preparatas pasižymėjo 1,90 U/g aktyvumu (3.2 lentelė). Daugiausiai baltymų (44 %) imobilizuota ant preparato, aktyvuoto 8,3 % GA, tačiau šio preparato aktyvumas yra mažesnis, nei preparatų, kuriuose naudota mažesnė GA koncentracija ir prisijungusi mažesnė aktyvumo dalis. Palyginus, panašų aktyvumą turi tiek 8,3, tiek 2,3 % GA aktyvuoti preparatai, tačiau 2,3 % GA aktyvuotame preparate prisijungusi baltymo dalis yra mažesnė (24 %) nei aktyvuotame maksimaliu GA kiekiu (44 %).



3.1 pav. Santykinis imobilizuoto preparato aktyvumas (■) (maksimalus aktyvumas prilygintas 100 %), imobilizuota aktyvumo (■) ir baltymo (□) dalis, lignino aktyvavimui naudojant įvairias GA koncentracijas.

Kovalentinis imobilizavimas ant magnetinio lignino, naudojant tą patį fermento kiekį kaip adsorbicijai, tiek baltymo imobilizavimo, tiek ir imobilizuoto preparato aktyvumo atžvilgiu yra ženkliai efektyvesnis, kovalentinės imobilizacijos būdu gaunamas apie 11 kartų didesnis preparato aktyvumas (1,9 U/g lyginant su 0,17 U/g) (3.1 lentelė 3.2 lentelės).

### 3.1.2.2 Kovalentinis imobilizavimas ant polimerinių nešiklių

Fermentų imobilizavimui buvo panaudoti VU ChF polimerų katedroje aktyvuoti gamtiniai polimeriniai nešikliai: poliuretano pagrindu – PU3 – H11, chitozono pagrindu (S-CHZ) – skiepytasis chitozanas, bei Granocell – 2000 (GR-2000) ir Granocell – 4000 (GR-4000) – makroporinga celiuliozė. Lipazės imobilizuotos kovalentinio prijungimo būdu. PU atveju kovalentiniai ryšiai susidaro tarp nešiklio izocianato grupių ir fermento amino- ir hidroksi- grupių. Dažniausiai reakcijų tarp GA ir fermento amino grupių metu susidaro Šifo bazės. Neskaitant šios reakcijos, dėl poringos PU ir S-CHZ struktūros galėjo vykti ir lipazės adsorbicija ar įterpimas į mikrodalelių poras.

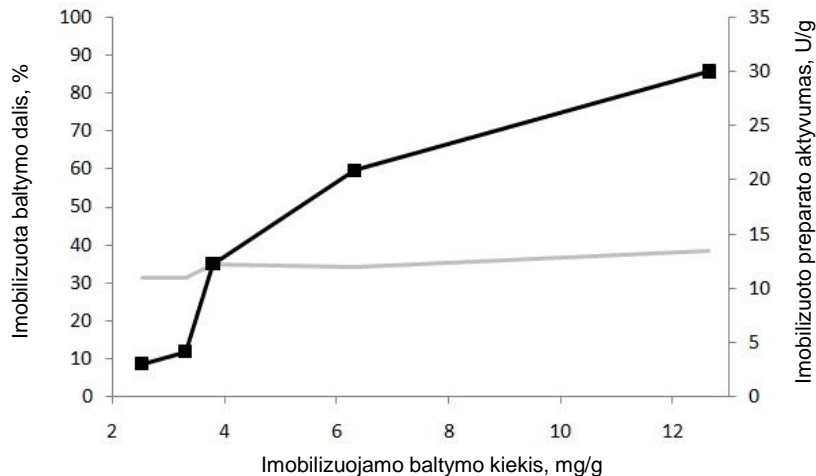
Didžiausiais aktyvumais pasižymėjo ant Gr-2000 ir Gr-4000 ir PU nešiklių kovalentiškai imobilizuotų lipazių preparatai (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Kovalentiniu būdu ant skirtingų polimerinių nešiklių imobilizuotos *Enterobacter aerogenes* preparatų palyginimas.

Nešiklis	Imobilizuoto preparato aktyvumas, U/g,	Savitasis imobilizuoto baltymo aktyvumas, U/mg <sub>baltymo</sub>	Imobilizuota baltymo dalis, %	Imobilizuotas baltymas, mg/g
Magnetinis ligninas	1,9	0,05	44,4	16,5
S-CHZ	7,6	0,92	30,9	8,25
Gr-2000	36,2	6,27	51,8	5,8
Gr-4000	38,8	6,72	52,7	5,8
PU	30,0	2,37	38,6	12,6

Didžiausią ir mažiausią aktyvumą turinčių preparatų aktyvumai (U/g) skyrėsi 20 kartų (ant Gr-4000 ir ant magnetinio lignino), tačiau imobilizuota baltymo dalis visų nešiklių atveju skyrėsi mažiau nei 2 kartus. Ant aktyviausių Granocell nešiklių imobilizuota mažiau baltymo (apie 6 mg/g), ko gero, lipazė imobilizuojama specifškiausiai. Tai gali lemti šios specialiai paruoštos celiuliozės porų struktūra: ant nešiklio lipazė imobilizuojama dviem būdais, tuo pačiu vykstant ir adsorbcijai ir kovalentinei imobilizacijai. Ant magnetinio lignino bei S-CHZ taip pat imobilizuojama didelė dalis baltymų, tačiau arba baltymai imobilizuojami neatrankiai, arba imobilizacijos metu lipazė inaktyvuojama, todėl preparatų aktyvumas palyginus nedidelis. Preparato aktyvumą, priklausomai nuo to, kiek jame yra imobilizuota baltymo, apibūdina savitojo imobilizuoto baltymo aktyvumo dydis, taigi Granocell ir PU nešikliai yra tinkamiausi lipazės *Enterobacter aerogenes* imobilizacijai.

Detaliau buvo ištirta lipazės imobilizacijos priklausomybė nuo baltymo kiekio, nešikliu naudojant PU. Nustatyta, kad imobilizuoto preparato aktyvumas ženkliai didėja, didėjant imobilizuojamo baltymo kiekiui, nors didėjant imobilizuojamų baltymų koncentracijai, imobilizuota baltymo dalis kinta nežymiai nuo 31 iki 38 %, kas leidžia manyti, kad ant nešiklio imobilizuojasi aktyvūs fermentai, o ne balastiniai baltymai, be to, nešiklio įsotinimas baltymais tirtame intervale nėra pasiekiamas.



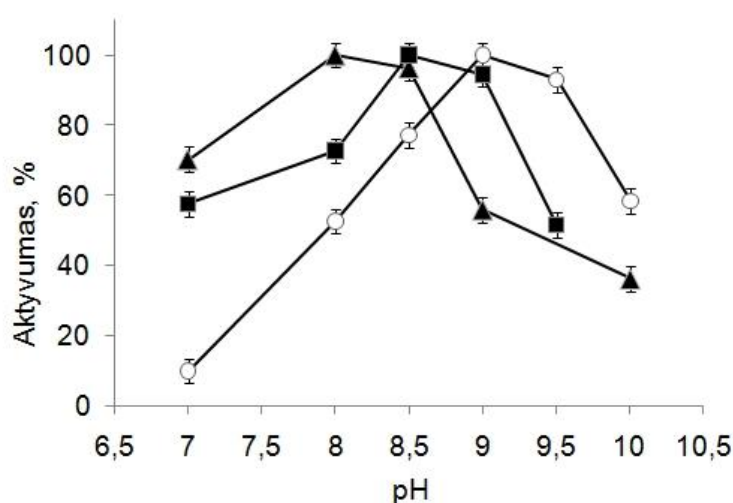
3.2 pav. Ant PU nešiklio imobilizuotos *E. aerogenes* lipazės preparato aktyvumas ir imobilizuota baltymo dalis, priklausomai nuo imobilizuojamo baltymo kiekio. — - imobilizuota baltymo dalis, —■— - imobilizuoto preparato aktyvumas.

Palyginę dviejų imobilizacijų - kovalentinės ir adsorbcijos – rezultatus, matome, kad kovalentinės imobilizacijos atveju aptinkami didžiausi preparatų aktyvumai (imobilizuojant ant Granocell), kurie apie 13 kartų viršija didžiausius aktyvumus, registruojamus imobilizavus adsorbcijos būdu (nešiklis – m-CHT) (3.1 lentelė, 3.2 lentelė). Kovalentiškai imobilizavus ant S-CHZ gauti apie 7 kartus didesni aktyvumai, nei adsorbavus ant m-CHZ. Nors tirti skirtingi nešikliai, tačiau jų prigimtis panaši, todėl galima teigti, kad tirtų fermentų ir nešiklių atveju kovalentinė imobilizacija buvo pranašesnė už adsorbciją.

### 3.1.3 Natyvių ir imobilizuotų *Enterobacter aerogenes* lipazės preparatų savybės

Yra žinoma, kad fermentų aktyvumas priklauso nuo jų krūvio, konformacijos, substrato patekimo ir produkto atpalaidavimo į / iš aktyvaus centro greičio. Kiekvienam individualiam fermentui būdingos skirtingos optimalios veikimo sąlygos (pH, temperatūra), substratinis savitumas, kurias gali keisti fermentą imobilizavus dėl fermento konformacijos, krūvio, stangrumo pokyčių. Todėl buvo ištirtos tirpios *E. aerogenes* lipazės ir imobilizuotų jos preparatų pagrindinės fizikinės ir cheminės savybės – katalizinio aktyvumo priklausomybė nuo temperatūros, pH, riebalų rūgšties

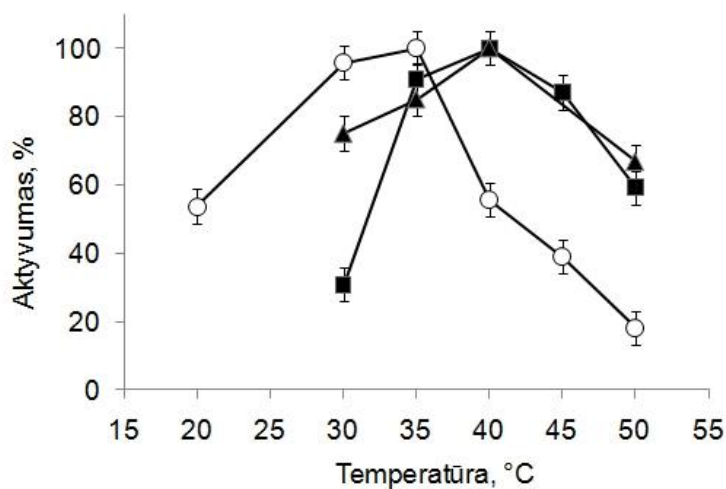
grandinės ilgio p-NP esteriuose. Dalinai išgryninta tirpi *E. aerogenes* lipazė buvo aktyviausia švelniai šarminėje aplinkoje, pH optimumui esant apie 9,0. Esant pH 7,0, jos aktyvumas tesiekė 10 % didžiausio aktyvumo, o esant pH 10,0 buvo išlaikoma apie 60 % maksimalaus aktyvumo (3.3 pav.). Šiek tiek žemesnės pH vertės buvo optimalios kovalentiškai imobilizuotos lipazės ant PU (pH 8,5) ir magnetinio lignino (pH 8,0) aktyvumui. Šie preparatai pasižymėjo santykinai didesniu aktyvumu neutralioje terpėje: lignino-lipazės preparatas išlaikė 70 % maksimalaus aktyvumo, PU-lipazės preparatas - 57 %.



3.3 pav. Reakcijos pH įtaka tirpios (○) ir kovalentiškai imobilizuotos ant įmagnetinto lignino (▲) ir PU (■) *E. aerogenes* lipazės aktyvumui.

Kataliziniam veikimui optimali reakcijos temperatūra pasislinko nuo 35 °C (tirpios lipazės) iki 40 °C ant lignino ir PU imobilizuotos lipazės (3.4 pav.). Galima būtų manyti, kad imobilizuota lipazė turėtų būti ir stabilesnė aukštesnėse temperatūrose, tačiau imobilizuotos lipazės terminis stabilumas nebuvo padidėjęs lyginant su tirpia lipaze, laikant 8 minutes 60 °C temperatūroje, nes abu preparatai prarado apie 50 % savo aktyvumo. Kumari ir kt. ant silikagelio imobilizuota *E. aerogenes* lipazė po valandos 60 °C temperatūroje išlaikė praktiškai 100 % savo pradinio aktyvumo, o tirpi lipazė tomis pačiomis sąlygomis išsaugojo apie 35 % aktyvumo [234]. Ši ženkliai didesnį ne tik imobilizuotos, bet ir tirpios lipazės stabilumą aukštoje

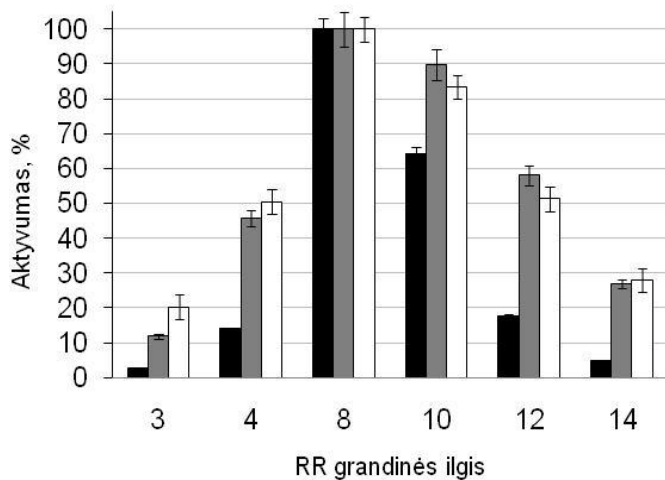
temperatūroje gali sąlygoti kitas tirtas *E. aerogenes* kamienas, preparatų grynumas; imobilizuotos lipazės atveju – nešiklis ir imobilizavimo būdas.



3.4 pav. Reakcijos temperatūros įtaka tirpios (○) ir kovalentiškai imobilizuotos ant įmagnetinto lignino (▲) ir PU (■) *E. aerogenes* lipazės aktyvumui.

Nors lipazė ir nepasižymėjo termostabilumu, ji buvo labai stabili, laikant preparatą tiek +4 °C, tiek +20 °C. Po 4 mėnesių laikymo pH 6-8 likutinis aktyvumas buvo 44-47 % .

*Enterobacter aerogenes* - 13 specifiskumas RR grandinės atžvilgiu tirtas naudojant skirtingo grandinės ilgio (C3-C14) *p*-nitrofenilo (NP) RR esterius. Tiek tirpaus, tiek imobilizuotų preparatų atveju hidrolizė vyko greičiausiai naudojant *p*-NP-kaprilatą (C8), todėl akivaizdu, kad lipazė teikia pirmenybę vidutinio grandinės ilgio RR (3.5 pav.).



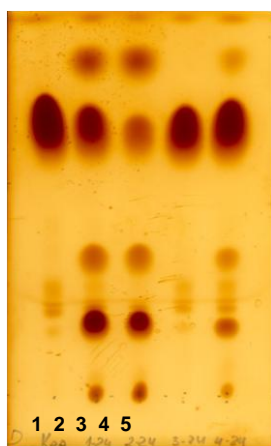
3.5 pav. Tirpios (■) ir kovalentiškai ant S-CHZ (■) ir PU (□) imobilizuotos *E. aerogenes* lipazės santykinis aktyvumas skirtingo RR grandinės ilgio *p*-NP esterių atžvilgiu.

Be to, iš pateiktų 3.5 pav. duomenų matyti, kad ir visų kitų esterių atžvilgiu imobilizuotų preparatų santykinis katalitinis aktyvumas buvo žymiai didesnis, nei tirpaus fermento, taigi imobilizavimas praplėtė fermento specifiškumo ribas RR grandinės ilgio atžvilgiu.

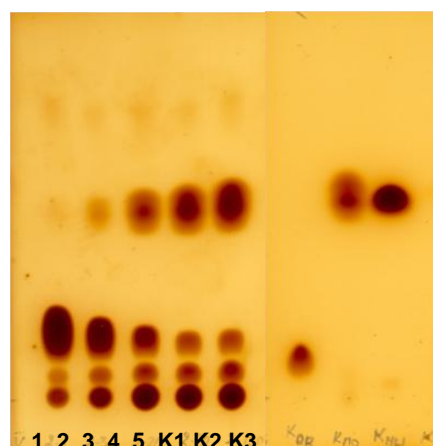
#### 3.1.4 *Enterobacter aerogenes* lipazės galimybės katalizuoti peresterinimą

Ištirta galimybė panaudoti *E. aerogenes* lipazę RR metilo esterių (biodyzelino) sintezei. Pasirinkta rapsų aliejaus (RA) peresterinimo reakcija, katalizuojama *E. aerogenes* lipazės preparatais, imobilizuotais adsorbcijos būdu ant m-CHT ir m-CHZ. Po 24 reakcijos valandų su m-CHZ-lipazės preparatu metilo esterių koncentracija buvo labai maža, o m-CHT-lipazės preparatas pasižymėjo didesniu peresterinimo aktyvumu (3.6 pav.). Šie rezultatai sutinka su preparatų aktyvumu hidrolizės reakcijose, kai ant chitino imobilizuoti preparatai taip pat buvo aktyvesni, nei ant chitozano 3.1.1 (skyrius). Reakciją katalizuojant preparatu, imobilizuotu ant m-CHT (0,3 U/ml), metilo esterių susidarymas buvo aptinkamas po 3 reakcijos valandų, o po 72 val. reakcijos buvo likę tik 43 % rapsų aliejaus. Kita dalis buvo peresterinta iki glicerolio, mono-, di-acilglicerolių ir laisvų RR (3.7 pav.). Po 124 valandų reakcijos trukmės RA peresterinimo reakcijos produktus sudarė

metilo esteriai (35 %), RR (21 %), mono, di- ir triacilgliceroliai (44 %). Literatūros duomenimis peresterinimo reakcijose, kai izoamilacetatas gaunamas iš izoamilo alkoholio ir vinilacetato organiniame tirpiklyje 40 °C per 60 val. naudojant ant silikagelio kovalentiškai imobilizuotą ir skersai susiūtą *E. aerogenes* lipazę, pasiekta 64 % išeiga, o naudojant tirpią - 18 % [234]. Braivėlių aliejų peresterinant metanoliu *t*-butanolyje, naudojant minėtą *E. aerogenes* lipazės preparatą (50 U), per 48 val. pasiektas 68 % peresterinimo laipsnis [235]. Tyrimų metu reakcijai katalizuoti naudotas daug mažesnis fermento aktyvumas, reakcija atlikta be tirpiklio, todėl mažesnis konversijos laipsnis yra tikėtinas.



3.6 pav. RA peresterinimas metanoliu (reakcijos trukmė - 24 val.), naudojant skirtingus ant CHT ir CHZ adsorbuotus *E. aerogenes* P-3 preparatų kiekius. Takeliai: 1 RA kontrolė; 2-5 % m-CHT; 3-10 % m-CHT; 4-5 % m-CHZ; 5-10 % m-CHZ.



3.7 pav. RA peresterinimo metanoliu, naudojant 10 % (m/v) ant m-CHT adsorbuoto *E. aerogenes* preparato (atitinka 0.3 U), priklausomybė nuo reakcijos trukmės. Takeliai: r-jos mišinys po: 1-1 val.; 2-3 val.; 3-24 val.; 4-72 val.; 5-124 val.; kontrolės: K1 - oleino rūgštis; K2 - metiloleatas; K3 - metillinoleatas.

Nors m-CHT preparatas ir negali savo aktyvumu varžytis su komerciniais grybinių lipazių preparatais, kuomet daug didesnė konversija gaunama per trumpesnę reakcijos laiką [163], tačiau perspektyvų tam turi. Norint pasiekti geresnių rezultatų reikia optimizuoti imobilizacijos ir katalizės procesus. *E. aerogenes* lipazės tyrimų rezultatais rėmėsi UAB „Biocentras“



vykdyti ir vykdomi biotechnologiniai tyrimai, šis mikroorganizmas bei jo sintetinama lipazė toliau tiriami ir naudojami riebių atliekų skaidymui [236].

Skyriaus išvados:

1. Ištirta *Enterobacter aerogenes* lipazės imobilizacijos efektyvumo priklausomybė nuo imobilizacijos tipo, nešiklio prigimties ir imobilizuojamo baltymo kiekio. Kovalentinė imobilizacija buvo efektyvesnė, nei adsorbcija, imobilizuojant ant magnetinio chitino darinių imobilizuoto preparato aktyvumas didėja, didėjant įmagnetinimo laipsniui, priešinga tendencija stebima imobilizuojant ant magnetinio chitozano.
2. Didžiausiu aktyvumu pasižymi ant Granocell 2000 ir Granocell 4000 (atitinkamai 36 ir 38  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g}$  nešiklio)) bei ant poliuretanino nešiklio – 30  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{g}$  nešiklio) kovalentiškai imobilizuotos lipazės preparatai. Imobilizuota 52 % ir 53 % (Granocell 2000 ir 4000) ir 39 % (poliuretaninis nešiklis) imobilizavimui naudotų baltymų.
3. Ant poliuretaninio nešiklio imobilizavus *Enterobacter aerogenes* lipazę katalizinio veikimo pH optimumo vertė pasislenka link neutralių pH verčių srities (8,0 - 8,5, tirpus fermento 9,0), temperatūros optimumas padidėja (40 °C vietoj 30 °C); kaip ir tirpus fermentas, imobilizuotas jo preparatas savičiausias oktano rūgšties p-nitrofenilo esterui, tačiau kitų RR p-nitrofenilo esteriams aktyvumas santykinai didesnis.
4. Ant magnetinio chitino (Fe-21,6 %) imobilizuota *Enterobacter aerogenes* lipazė per 72 val. kambario temperatūroje metilo alkoholiu transesterina 53 % rapsų aliejaus, o po 124 val. aptinkama 35 % RR metilo esterių 21 %, riebalų rūgščių, ir 44 % mono-, di- ir triacilglicerolių.

## **3.2 Trioleino hidrolizės ir peresterinimo reakcijų tyrimas, naudojant atsako paviršiaus metodologiją**

### **3.2.1 Trioleino hidrolizė**

#### **3.2.1.1 Tiriamos reakcijos ir fermentų pasirinkimas**

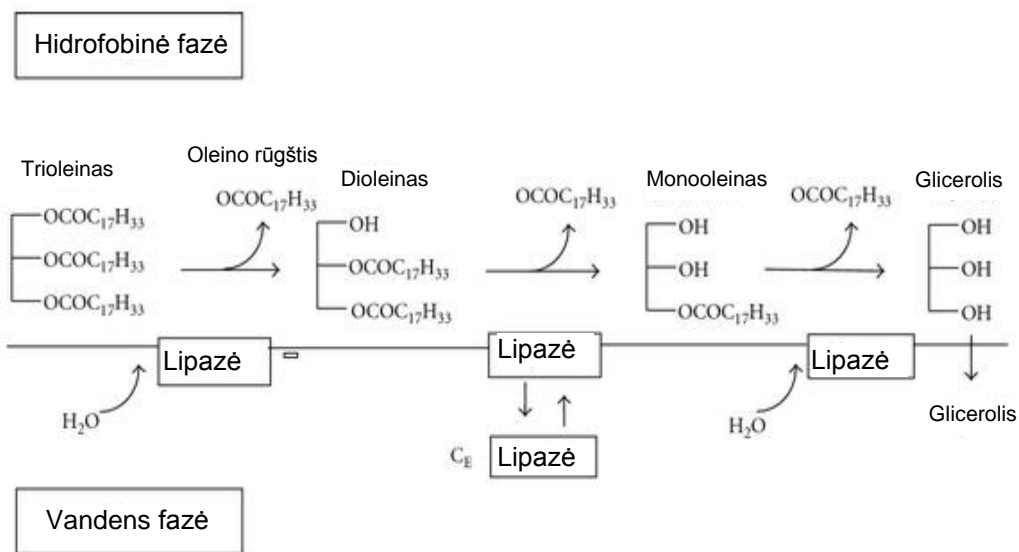
Triacilglicerolių (TAG) hidrolizė – tai trigliceridų (riebalų) molekulių esterinio ryšio skaidymas susidarant laisvosioms riebalų rūgštims ir gliceroliui. Tikslinis reakcijos produktas gali būti tam tikros riebalų rūgštys arba glicerolis, kitais atvejais svarbesnis yra pats riebalų suskaidymas. Fermentinės TAG hidrolizės produktai – RR – gali būti naudojamos muilo gamybai, jų spalva ir kvapas geresni, lyginant su gautomis cheminės hidrolizės būdu. Fermentinis metodas turi didelį pranašumą norint gauti laisvas nesočiausias RR, nes vykdant įprastinę hidrolizę sunku išvengti nepageidaujamos lipidų oksidacijos ir kitų šalutinių reakcijų. Riebalų hidrolizės reakcijose aktyvios lipazės reikalingos riebalams pašalinti iš gamybinių atliekų, kanalizacijos, jos naudojamos pramonės procesuose, pvz. odos apdirbimui ir kt. [237]. Efektyvi riebalų hidrolizė būtina naudojant lipazių preparatus detergentams gaminti [238]. Fermentinis riebalų skaidymas yra intensyviai tiriama sritis, tiek naudojant imobilizuotus ant hidrofobinių polimerinių nešiklių fermentus, tiek skystus fermentus vandens/riebalų paviršiaus sąlyčio riboje [26].

Hidrolizės reakcija pasirinkta tiek taikomųjų tikslų (dėl reakcijos aktualumo, siekiant atrinkti aktyvias lipazes ir nustatyti optimalias reakcijos sąlygas), tiek dėl fundamentinių (norint palyginti, ar fermentų aktyvumas šios reakcijos atžvilgiu koreliuoja su aktyvumu peresterinimo reakcijoje tomis pačiomis sąlygomis). Literatūroje šiuo klausimu pateikiamos skirtingos nuomonės: yra teigiančių, kad aktyvumas hidrolizės ir sintezės reakcijose dažniausiai koreliuoja [239], kiti teigia priešingai [240]. Tačiau dažniausiai lyginami hidrolizės vandeninėje terpėje ir peresterinimo organinėje terpėje rezultatai, todėl aktyvumai gali nekoreliuoti dėl skirtingos reakcijos terpės.

Taigi buvo nuspręsta palyginti lipazių aktyvumus ir optimalias reakcijos sąlygas hidrolizės ir sintezės reakcijų atžvilgiu vienodomis sąlygomis.

Modeliniu substratu buvo pasirinktas trioleiną (TO), visose padėtyse turintis nesočiąją oleino rūgštį (C18:1), o tirpikliu - heksanas. TO fermentinės hidrolizės reakcijos schema pavaizduota 3.8 pav.

Tyrimams pasirinkti trys maisto pramonėje naudojamų lipazių preparatai: Palatase 20000 L (toliau - Palatase), Lipopan F BG, Lipopan 50 BG ir vieną fosfolipazės preparatą Lecitase Ultra (toliau – Lecitase) (Novozymes®). Maisto pramonei skirti fermentai pasirinkti dėl kelių priežasčių: preparatai jau yra rinkoje, pakankamai dideli jų gamybos mastai ir prieinamos kainos, todėl juos lengviau pritaikyti ir naujiems pramoniniams procesams. Be to, šie fermentai atitinka maisto gamyboje naudojamų medžiagų reikalavimus, todėl yra įdomūs kuriantiems naujas maisto technologijas.



3.8 pav. Fermentinės trigliceridų hidrolizės schema dviejų fazių paviršiaus sąlyčio riboje [241]

Palatase 20000 L (*Rhizomucor miehei* lipazė) skirta fermentinių sūrių (ypač itališkų) aromatams sukurti. Šis preparatas geriau hidrolizuoja trumpagrandžių RR esterius, ir atskeltos laisvos RR lemia intensyvesnį aromatą [242]. Lecitase Ultra - tai skysta fosfolipazė A1, sukurta sujungus

*Thermomyces lanuginosus* lipazės ir *Fusarium oxysporum* fosfolipazės genus, skirta augalinio aliejaus išskyrimui iš spaudimo metu susidariusio šalutinio produkto - išspaudų „gumų“. Ji nehidratuojamus fosfatidus (gumas) paverčia į hidratuojamus fosfatidus. Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG - tai kepiniams skirtos lipazės. Pirmosios šaltinis – *Rhizopus oryzae* (remiantis kitu šaltiniu - *Fusarium oxysporum*)[28], antrosios – *Thermomyces lanuginosus* mikroorganizmai. Šios lipazės pagerina tešlos savybes (pakeičia polinių ir nepolinių miltų lipidų savybes, didina tešlos tvirtumą, plutos savybes) [34]. Visų šių lipazių gamyba remiasi genetiškai modifikuotų organizmų technologijomis, produkuojantis mikroorganizmas - *Aspergillus oryzae*.

### **3.2.1.2 Eksperimento plano sudarymas**

Atsako paviršiaus metodologija (APM) - tai matematinių ir statistinių eksperimento planavimo, matematinio regresinio modeliavimo ir optimizavimo metodų rinkinys, kuris naudojamas sąveikai tarp atsako ir nepriklausomų kintamųjų (faktorių) apibūdinti [243]. Sudarytas modelis grafiškai išreiškiamas kaip trimatis (daugiamatis) atsako paviršius (tiriamo objekto dydžių, nusakančių jo savybes priklausomybė nuo faktorių, veikiančių objektą). Terminas atsako paviršiaus metodologija (angl. Response surface methodology, RSM) pasirinktas, kaip aiškiausiai apibūdinantis šią sąvoką. Nors Levišausko ir Tekoriaus leidinyje modeliavimo rezultatų vaizdavimui apibūdinti naudojamas terminas „reakcijos paviršius“ [244], tačiau biochemijos mokslo srities atveju, kuomet APM modeliu aprašomos pačios cheminės reakcijos, toks terminas įveltų daug nesusipratimų, todėl pasirinktas terminas – atsako paviršius.

Kiekvieną reakciją (ar gamybinį procesą) galima atlikti skirtingomis sąlygomis, nuo kurių priklauso reakcijos eiga ir rezultatas. Optimalios sąlygos – tai taip parinkti reakcijos eigą lemiantys veiksniai (nepriklausomi kintamieji), kad būtų gaunama pageidaujama reakcijos produkto išeiga – atsakas

(pavyzdžiui, maksimali tam tikro produkto koncentracija). Šių sąlygų nustatymas vadinamas reakcijos (procesu) optimizavimu.

Klasikiniu optimizavimo atveju vienu metu keičiamas vienas reakcijos veiksnys, kitų vertė palaikoma pastovi. Šis metodas ne tik atima daug laiko, tačiau neaprašo visų fizikocheminių veiksnių tarpusavio sąveikos. Tuo tarpu APM yra efektyvus statistinis būdas kurti, gerinti ir optimizuoti kompleksinius procesus, nes naudojant APM vienu metu keičiami visi reakcijos veiksniai, nustatomas ryšys tarp jų. APM aprašo nepriklausomų kintamųjų, pavieniui ar kartu, įtaką procesams bei sukuria matematinį modelį. Bandymų skaičiui sumažinti naudojami kompoziciniai planai, kuriuos pasiūlė Boksas ir Vilsonas [244].

Pasirinkus reakcijos tipą, katalizuojančias lipazes, svarbu pasirinkti tirpiklį, reakcijos temperatūrą ir trukmę. Tirpikliu pasirinktas įprastai naudojamas ir dažniausiai gerai tinkantis lipazių katalizuojamoms reakcijoms heksanas, o TO hidrolizės reakcijos temperatūros ir trukmės įtakai įvertinti pasirinktas APM centrinis kompozicinis eksperimento planas. Trukmė ir temperatūra – skaitiniai veiksniai, fermento tipas – kategorinis veiksnys. TO hidrolizė heksane buvo tiriama 20 - 180 minučių reakcijos trukmės ir 30 – 60 °C temperatūros intervale naudojant keturis skirtingus fermentų preparatus: Palatase, Lecitase, Lipopan F BG and Lipopan 50 BG. Buvo vertina šių veiksnių įtaka TO ir oleino rūgšties (OR) koncentracijoms. Eksperimento planas bei atsakų vertės (eksperimento rezultatai ir modeliavimo rezultatai) pateikti P.1 lentelėje.

### **3.2.1.3      *Statistinė analizė ir modelio pasirinkimas***

Atlikus statistinę analizę (žr. 2.13.2 metodų skyriuje), kvadratinis modelis pasirinktas kaip aukščiausio laipsnio reikšmingas modelis, kurio neatitikimas nereikšmingas. Išoriškai studentizuotų paklaidų diagnostikos testas padėjo aptikti duomenis, kurie buvo prastai aprašomi modeliu. Šie matavimų duomenys buvo pašalinti iš analizės (P.1 lentelėje pavaizduoti

išbraukti). Duomenų analizė taikant įvairius modelius (tiesinį, dviejų faktorių sąveikos, kvadratinį) ir jų dispersinę analizę (ANOVA) parodė, kad abu atsakai (TO ir OR koncentracijų priklausomybė nuo reakcijos sąlygų) geriausiai buvo aprašomi antro laipsnio polinomiais modeliais (2.1 lygtis 93 psl.).

Modelių F vertės 6,47 ir 37,54 reiškia, kad modeliai statistiškai reikšmingi. Egzistuoja tik 0.01 % galimybė, kad tokios dydės modelių F-vertės atsirastų dėl triukšmų (paklaidų, natūralaus išsibarstymo) (p vertės <0.0001), taigi modeliai yra tinkami ryšiui tarp atsako ir reikšmingų nepriklausomų kintamųjų aprašyti. Liekamųjų paklaidų neatitikimo įvertinimas lyginant su teorine paklauda (F vertė TO modelio atveju 0,54, OR 1,86) parodė kad neatitikimas yra nereikšmingas. ANOVA TO ir OR atsakų modeliams pateikta atitinkamai 3.3 ir 3.4 lentelėse.

3.3 lentelė. TO hidrolizės TO koncentracijos kvadratinio modelio ANOVA (I dalis)

Šaltinis	Kvadratų suma	Laisvės laipsniai	Vidutinis kvadratas	F vertė	p-vertė, P > F
Modelis	8800.07	14	628.58	6.47	<0.0001 reikšmingas
A-Trukmė	151.25	1	151.25	1.56	0.2203
B-Temperatūra	19.42	1	19.42	0.2	0.6575
C-Fermentas	7043.22	3	2347.74	24.16	<0.0001
AB	31.2	1	31.2	0.32	0.5745
AC	88.46	3	29.49	0.3	0.8227
BC	511.05	3	170.35	1.75	0.1736
A <sup>2</sup>	859.49	1	859.49	8.84	0.0052
B <sup>2</sup>	77.3	1	77.3	0.8	0.3784
Liktinė paklauda	3498.51	36	97.18		
Neatitikimas	1411.31	20	70.57	0.54	0.9032 nereikšmingas
Teorinė paklauda	2087.2	16	130.45		
Patiksl. bendra*	12298.59	50			

\* – bendra kvadratų suma, patikslinta vidurkiui

3.4 lentelė. TO hidrolizės OR koncentracijos kvadratinio modelio ANOVA (II dalis)

Šaltinis	Kvadratų suma	Laisvės laipsniai	Vidutinis kvadratas	F vertė	P-vertė, P > F
Modelis	9310.4	14	665.03	37.54	<0.0001 reikšmingas
A-Trukmė	1032.94	1	1032.94	58.3	<0.0001
B-Temperatūra	231.38	1	231.38	13.06	0.0009
C-Fermentas	7173.13	3	2391.04	134.96	<0.0001
AB	0.4	1	0.4	0.02	0.8816

AC	396.48	3	132.16	7.46	0.0005	
BC	229.97	3	76.66	4.33	0.0107	
A <sup>2</sup>	139.3	1	139.3	7.86	0.0082	
B <sup>2</sup>	31.8	1	31.8	1.79	0.1890	
Liktinė paklaida	620.1	35	17.72			
Neatitikimas	426.9	19	22.47	1.86	0.1073	nereikšmingas
Teorinė paklaida	193.2	16	12.07			
Patiksl. bendra*	9930.5	49				

\* – bendra kvadratų suma, patikslinta vidurkiui

p-Vertės "P > F" mažesnės nei 0,05 reiškia, kad modelio dedamosios yra reikšmingos. TO koncentracijos modelio atveju C ir A<sup>2</sup> yra statistiškai reikšmingos modelio dedamosios. OR koncentracijos modelio atveju reikšmingos dedamosios A, B, C, AC, BC, A<sup>2</sup> ir B<sup>2</sup>. Teigiama, kad modelį galima pagerinti, pašalinant nereikšmingas dedamąsias iš modelio ir paliekant tik reikšmingas, tačiau B dedamoji nebuvo pašalinta iš TO koncentracijos modelio, nes ši dedamoji reikšminga OR koncentracijos modelyje (3.4 lentelė), o OR kiekis yra tiesiogiai priklausomas nuo TO hidrolizės.

Vertinant modelio tinkamumą, analizuojamos liekanos ir skaičiuojamas determinacijos koeficientas (R<sup>2</sup>) (prieduose pateiktos P.1 lentelė P.2 lentelė ir P.3 lentelė) ir P.3 lentelės). Determinacijos koeficientas parodo, kokią dalį tiriamojo požymio dispersijos akumuliuoja (apima) naudojamas matematinis modelis. Determinacijos koeficientai, koreguoti modelio parametrų skaičiui atitinkančiam eksperimento plano taškus, yra 0,6049 ir 0,9126 atitinkamai TO ir OR koncentracijų modeliams, t. y. modeliai gali paaiškinti 60,49 % ir 91,26 % atsako svyravimų. Vertės yra pakankamai didelės (ypač OR koncentracijų atžvilgiu), o, kas yra dar svarbiau, eksperimento planui prognozuotos R<sup>2</sup> vertės (atitinkamai 0,4969 ir 0,8526 TO ir OR modeliams) buvo artimos koreguotoms R<sup>2</sup> vertėms (jos neturėtų skirtis daugiau, nei per 0,2).

Atitinkamo tikslumo vertė yra signalo/triukšmo santykis. Pageidautina, kad vertė būtų didesnė nei 4. Abiejų modelių atveju šios vertės gerokai didesnės.

Pagal 2.1 lygtį, atsakas lygus nepriklausomų kintamųjų koeficientų ir koeficientų sandaugų sumai. Kintamųjų sąrašas ir normuotos bei realiai stebimos vertės pateiktos P.4 ir 3.5 lentelėse.

3.5 lentelė. Modelinių lygčių koeficientai, išreikšti realiai stebimomis vertėmis

Atsakas	Lygties narys					
	Laisvasis narys	A (trukmė)	B (temperatūra)	$AB \cdot 10^{-3}$	$A^2 \cdot 10^{-3}$	$B^2 \cdot 10^{-3}$
$Y_{1Pal}$	110,13	-0,31	-1,40	1,23	1,11	9,43
$Y_{1Lec}$	97,95	-0,29	-0,74	1,23	1,11	9,43
$Y_{1LipF}$	113,29	-0,29	-0,81	1,23	1,11	9,43
$Y_{1Lip50}$	93,08	-0,35	-0,66	1,23	1,11	9,43
$Y_{2Pal}$	27,43	0,25	-0,55	-0,15	-0,45	6,10
$Y_{2Lec}$	38,61	0,18	-1,09	-0,15	-0,45	6,10
$Y_{2LipF}$	10,97	0,11	-0,62	-0,15	-0,45	6,10
$Y_{2Lip50}$	25,23	0,17	-0,76	-0,15	-0,45	6,10

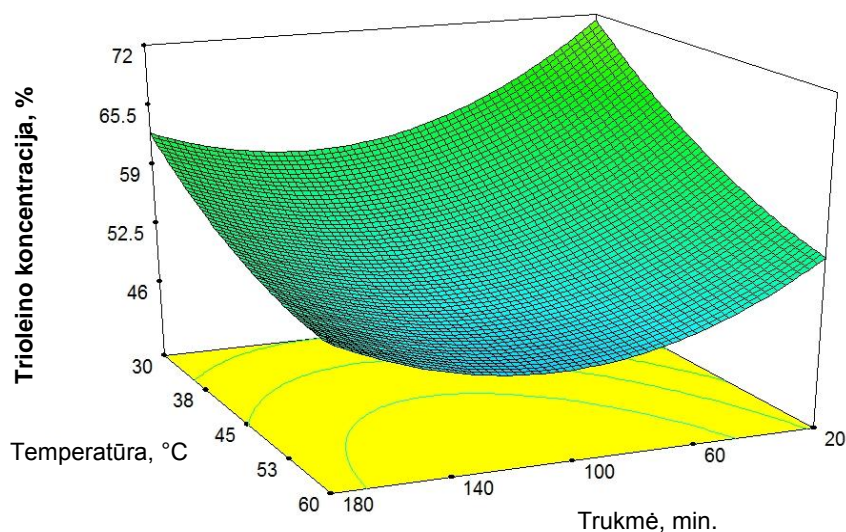
$Y_{1Pal}$ ,  $Y_{1Lec}$ ,  $Y_{1LipF}$ ,  $Y_{1Lip50}$  atitinka TO koncentracijas po reakcijos su Palatase, Lecitase, Lipopan F BG, Lipopan 50 BG.  $Y_{2Pal}$ ,  $Y_{2Lec}$ ,  $Y_{2LipF}$ ,  $Y_{2Lip50}$  atitinka OR koncentracijas po reakcijos su Palatase, Lecitase, Lipopan F BG, Lipopan 50 BG.

### 3.2.1.4 Grafinė reakcijos sąlygų įtakos išraiška

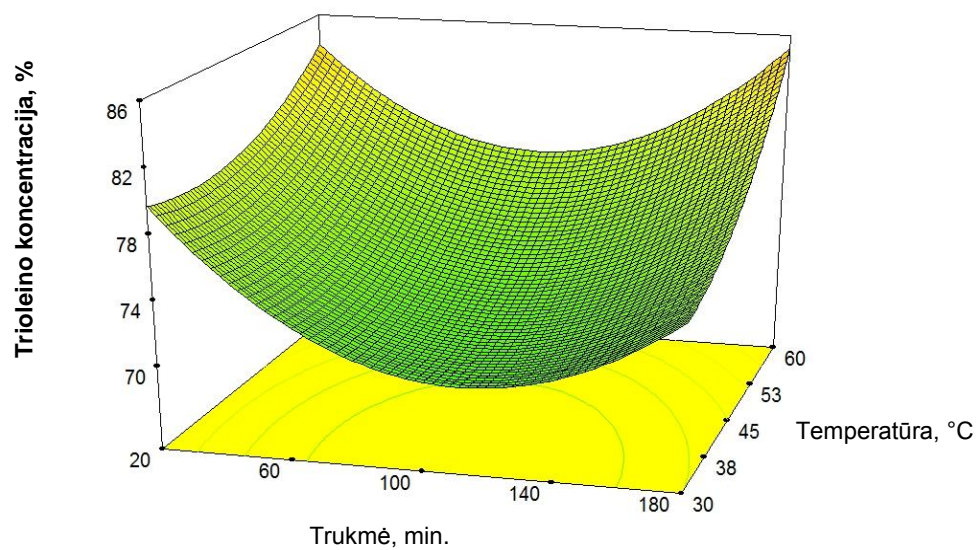
Norint geriau suprasti ryšį tarp reakcijos veiksnių (nepriklausomų kintamųjų) ir atsako (stebimo veiksnio, šiuo atveju substrato ir produkto koncentracijos), verta patyrinėti kontūrinius grafikus. 3.9 - 3.12 paveiksluose pateikti TO hidrolizės modelio TO koncentracijos atsako paviršiaus modeliai. TO koncentracijos priklausomybė nuo reakcijos trukmės ir temperatūros (du nepriklausomi kintamieji X ir Y ašyse) pavaizduota trimačiuose paveiksluose keturiems skirtingiems fermentams: Palatase (3.9 pav.), Lecitase (3.10 pav.), Lipopan 50 BG (3.11 pav.), Lipopan F BG (3.12 pav.). Reikėtų atkreipti dėmesį, kad grafikuose vaizduojamas likęs TO kiekis %, sunaudotas kiekis yra skirtumas tarp 100 % ir likusio kiekio. Naudojant bet kurį iš fermentų, norint pasiekti didžiausią TO hidrolizės laipsnį, reikalinga 100–140 minučių reakcijos trukmė. Geriausiai TO hidrolizę katalizuojančio fermento - Palatase - (hidrolizuota apie 52 % TO), šiuo atveju geresni rezultatai pasiekiami aukštesniame temperatūrų intervale (50–60 °C). Tuo tarpu naudojant Lecitase, Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG TO buvo geriau hidrolizuojamas žemesnėse temperatūrose (iki 40–45 °C). Šiomis sąlygomis duotame laiko intervale



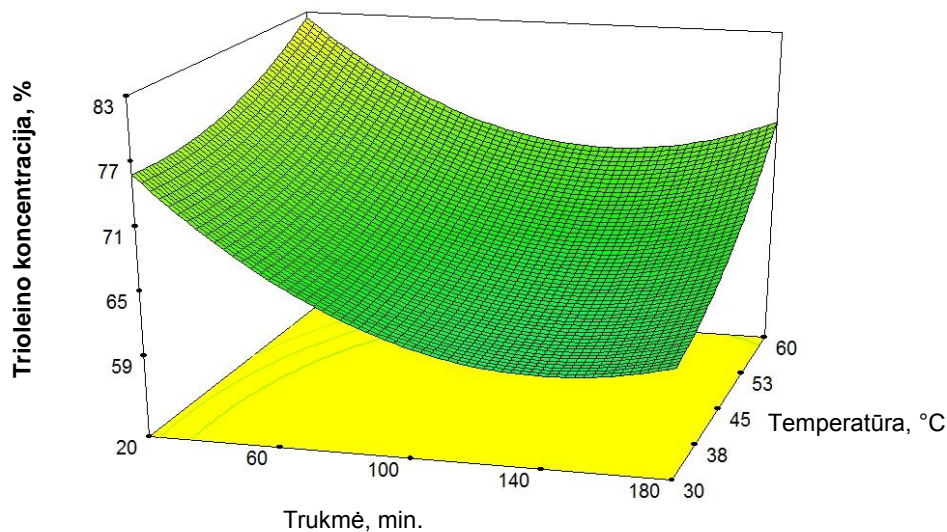
galima tikėtis apie 29 %, 17 % ir 40 % TO hidrolizės atitinkamai naudojant Lecitase, Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG.



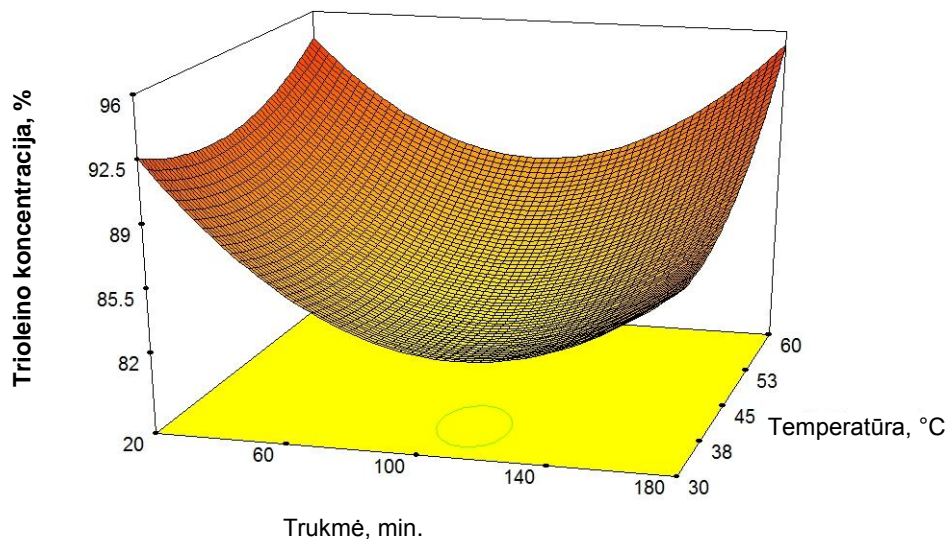
3.9 pav. TO hidrolizės TO koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Palatase



3.10 pav. TO hidrolizės TO koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lecitase



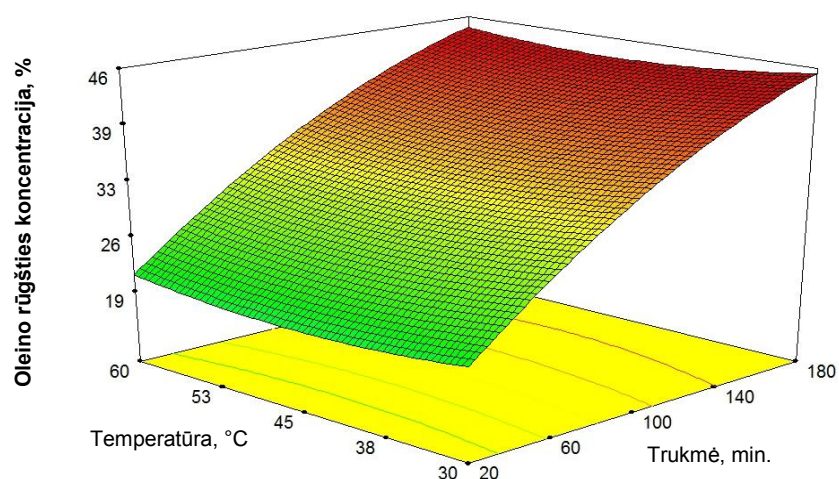
3.11 pav. TO hidrolizės TO koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lipopan 50 BG



3.12 pav. TO hidrolizės TO koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lipopan F BG

TO koncentracijos kitimas yra aktualus tais atvejais, kai svarbu efektyviai hidrolizuoti pačius riebalus, o galutiniai reakcijos produktai nėra svarbūs (pvz. aukščiau minėta riebalų hidrolizė atliekose, kanalizacijoje, panaudojimas skalbikliams, odos pramonėje). Tačiau jeigu hidrolizės reakcijos tikslas yra gauti galutinį produktą – išsiskyrusią RR - TO hidrolizės laipsnio įvertinimas nėra pakankamas kriterijus spręsti, kurio fermento pagalba efektyviausiai būtų gaunama RR, dėl to, kad viena TO molekulė pakopomis gali atpalaiduoti tris RR molekules (3.8 pav.). Kaip efektyviai ir ar visos trys esterinės jungtys bus

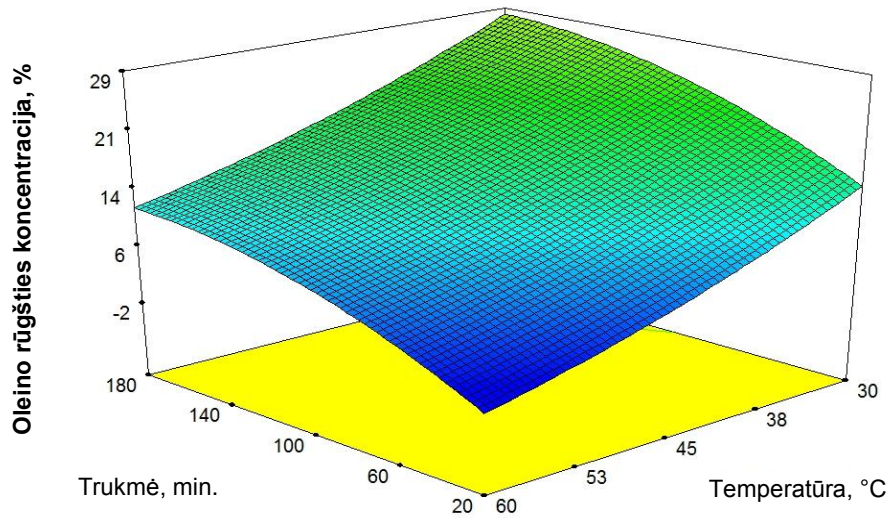
hidrolizuotos, priklauso nuo fermento specifiškumo ir kitų veiksnių, aprašytų 1.1.3.2, 1.6 literatūros skyriuose. Todėl esant 100 % TO hidrolizei laisvų OR koncentracija gali svyruoti nuo 33 % iki 100 % (pirmuoju ribiniu atveju hidrolizuota tik viena esterinė jungtis ir visas TO virtęs dioleinu, antruoju - hidrolizuotos visos trys esterinės jungtys). Taigi, dar vienas reakcijos vertinimo kriterijus buvo OR susidarymas. Kontūriniai grafikai pateikti 3.13 - 3.16 paveiksluose atitinkamai Palatase, Lecitase, Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG fermentams. Didžiausias OR kiekis (daugiau nei 40 %) susidarė veikiant Palatase fermentui (kaip aukščiau minėta, tai buvo geriausias fermentas TO hidrolizės atžvilgiu). Tačiau reakcijos temperatūros įtaka susidariusiam OR kiekiui buvo mažesnė, nei TO sunaudojimui, svarbiausias šiuo atveju buvo reakcijos trukmė. Tikėtina, kad esant aukštesnei temperatūrai santykinai greičiau vyksta TO hidrolizė iki dioleino, nei sekančios gliceridų hidrolizės reakcijos, o esant žemesnei temperatūrai TO hidrolizė vysta šiek tiek lėčiau, tačiau vis dar pakankamai greitos dioleino ir monooleino hidrolizės reakcijos, todėl susidarantis OR kiekis apylygis, esant įvairioms temperatūroms ir nežymiai mažesnis esant 45 °C temperatūrai.



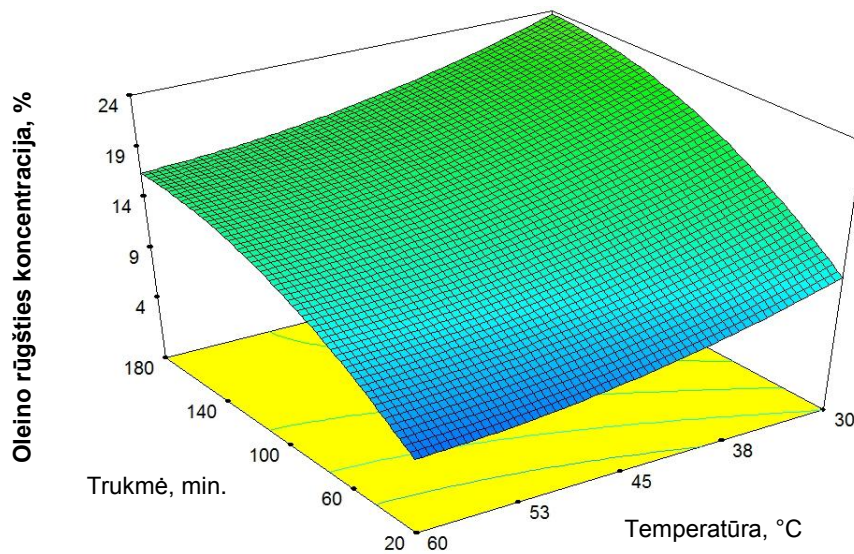
3.13 pav. TO hidrolizės OR koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Palatase

Lecitase ir Lipopan 50 BG fermentų atveju OR kiekis buvo didesnis reakcijas vykdant žemesnėse temperatūrose (3.14 ir 3.15 pav.) ir siekė atitinkamai 26 % ir 21 %. Geresnės OR išėigos esant žemesnei temperatūrai sutampa su TO hidrolizės modeliu, tik skirtumas tas, kad OR kiekis linkęs

didėti visą reakcijos laiką (vėlgi, tai yra natūralu, nes OR susidaro iš kitų tarpinių produktų – dioleino ir monooleino, net jeigu TO nehidrolizuojamas).

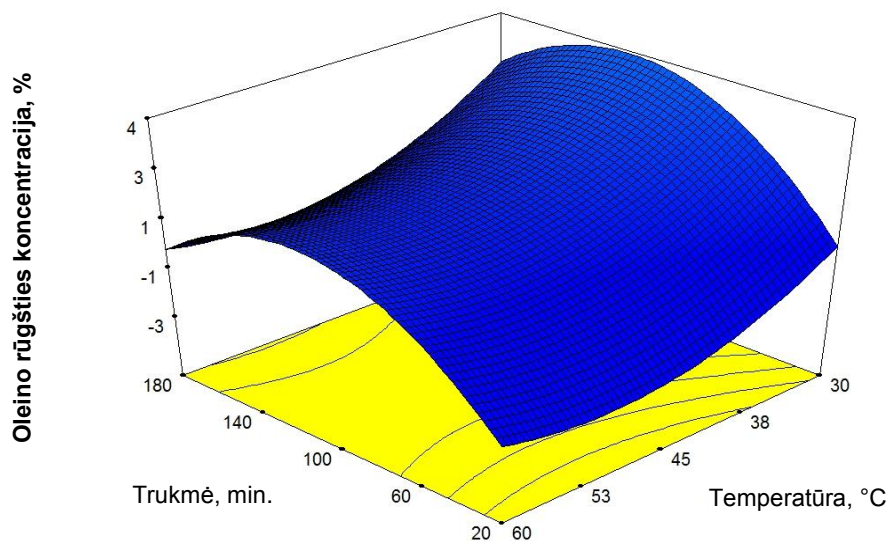


3.14 pav. TO hidrolizės OR koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lecitase



3.15 pav. TO hidrolizės OR koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lipopan 50 BG

Lipopan F BG atveju susidaręs OR kiekis buvo per mažas, kad būtų galima prognozuoti geras reakcijos sąlygas, tačiau šiek tiek OR susidarė esant žemoms temperatūroms (apie 30 °C) po 120 min (3.16 pav.).



3.16 pav. TO hidrolizės OR koncentracijos modelis katalizuojant fermentui Lipopan FBG

Bilyk ir kt. teigimu, naudojant imobilizuotą *Rhizomucor miehei* lipazę (disertacinio darbo metu naudota Palatase – to paties fermento skystas preparatas) reakcijos terpėje esant aminių galima pasiekti apie 90 % lajus hidrolizės iki RR laipsnį heksane per 6 val. 45 °C temperatūroje ir per 20 val. 20 °C temperatūroje. Maksimalus hidrolizės iki RR laipsnis – 95 %, o nenaudojant ko-katalizatorių (aminių) hidrolizės iki RR laipsnis tesiekia 76 %. Tačiau *C. rugosa* ir kiaulių kasos lipazė kur kas prasčiau katalizuoja hidrolizės reakciją (buvo pasiektas tik 65 % lajus hidrolizės laipsnis) [245]. Taigi, autoriai tyrė reakciją žymiai platesniame reakcijos trukmės intervale su reakcijos priedais ir pastebėjo, kad skirtingi fermentai nevienodai katalizuoja reakciją. Todėl, naudojant tirtą geriausiai hidrolizės reakciją katalizuojantį fermentą Palatase ir prailginus reakcijos trukmę, galima tikėtis didelio hidrolizės iki RR laipsnio. Be to, minėti autoriai teigia, kad imobilizuota RML neteikia pirmenybės RR ilgiui ar nesotumo laipsniui ir vienodai gerai hidrolizuoja trimiristiną, tripalmitiną, tristeariną ir trioleiną. Taigi, nors buvo tirta neimobilizuota fermento forma, tikėtina, kad aukščiau pateikti duomenys gali būti pritaikomi skirtingas RR turintiems trigliceridams (aliejam, riebalams).

### 3.2.1.5 Reakcijos optimizavimas

Siekiant rasti sąlygas, kurioms esant būtų galima gauti didžiausią OR išeigą ir pasiekti didžiausią TO hidrolizės laipsnį, buvo atliktas reakcijos sąlygų optimizavimas, t. y. nustatytos nepriklausomų kintamųjų vertės, kurioms esant būtų pasiekti apibrėžti tikslai. Optimizuojant buvo siekiama patenkinti šiuos kriterijus: minimizuoti TO koncentraciją, maksimizuoti OR koncentraciją (vidutinė santykinė svarba, indeksas 3), pirmenybė teikiama trumpesnei reakcijai ir žemesnei temperatūrai (mažesnė santykinė svarba, indeksas 2) (P.5 lentelė). Reakcijos trukmės ir temperatūros prioritetams buvo pasirinkta ne tik svarba, bet ir viršutinės intervalo dalies svarba, kuri prilyginta 0,1, tai lėmė platesnį kintamųjų sprendinių pasirinkimą. Paprastai tariant, siektinos koncentracijos buvo svarbesni kriterijai optimizuojant reakciją, nei trukmė ar temperatūra. Pirmenybė nebuvo teikiama nei vienam iš fermentų. Optimizavimas buvo atliekamas pagal standartines apibrėžiamas vertes: vykdoma 30 ciklų, filtruojami sutampantys sprendiniai (filtro  $\varepsilon = 0$ ), simplekso dalis 10 %, maksimalus sprendinių skaičius - 100.

Pirmieji keturi sprendiniai pateikti 3.6 lentelėje. Pirmieji du sprendiniai (140 min. reakcija 50,5 °C temperatūroje, naudojant Palatase fermentą), tiksliausiai atitinko iškeltus reikalavimus (trokštamumas 0,85). Prognozuota 49,8 % TO ir 39,8 % OR koncentracija. Atlikus eksperimentą išmatuota 40,4 % likusio TO koncentracija ir 38,9 % OR koncentracija. Išmatuota TO koncentracija optimizuotomis sąlygomis patenka į  $PI_{99\%}$  (99 % pasikliautinį intervalą) (39,5 – 60,1 % TO), OR koncentracija optimizuotomis sąlygomis patenka į  $PI_{95\%}$  (36,5 – 43 % OR).

3.6 lentelė. TO hidrolizės reakcijos optimizavimo pirmieji sprendiniai

Sprendinio nr.	Trukmė, min	Temperatūra, °C	Fermentas	TO, %	OR, %	Trokštamumas
1	139,4	50,5	Palatase	49,77	39,82	0,85
2	139,6	50,4	Palatase	49,82	39,83	0,85
3	141,5	30,0	Lipopan 50	59,89	22,78	0,68
4	142,7	30,0	Lipopan 50	59,9	22,83	0,68

Apibendrinant TO hidrolizės rezultatus, galime teigti, kad modelinio substrato TO hidrolizę geriausiai katalizavo Palatase fermentinis preparatas, optimaliomis sąlygomis per 140 min. hidrolizuojantis apie 60 % TO, (palyginus, Lecitase hidrolizavo apie 40 %, Lipopan F BG apie 18 %, Lipopan 50 BG apie 41 %), šis preparatas labiausiai tinkamas ir RR sintezei (per 3 val. susidaro 40 %). Norint pasiekti didesnę konversiją reikia didinti fermento koncentraciją arba ilginti reakcijos trukmę.

### **3.2.2 Trioleino peresterinimas metanolis**

Riebalų hidrolizė, kurios tyrimai aprašyti ankstesniame skyriuje, yra prigimtine lipazių vykdoma reakcija. Lipazės gali katalizuoti ir grįžtamąją – sintezės – reakciją, kuri yra ypatingai svarbi biotechnologijos pramonėje. Vienas iš sintezės reakcijų pavyzdžių - biodyzelino (riebalų rūgščių ir trumpos grandinės alkoholių esterių) sintezė. Fermentinė biodyzelino sintezė dažniausiai vykdoma peresterinimo būdu, substratais naudojant natūralius aliejus ir metanolį arba etanolį. Trioleino peresterinimo metanolis tirpiklyje (heksane) modelinė sistema ir ankstesniame skyriuje tirti keturi fermentai (Palatase, Lecitase, Lipopan F BG, Lipopan 50 BG) buvo pasirinkti, norint atrinkti geriausiai veikiančią fermentą, optimalias reakcijos sąlygas ir palyginti fermentų aktyvumus hidrolizės ir sintezės reakcijose tomis pačiomis sąlygomis.

Žemiau pateiktos APM modelių grafinės išraiškos be didelės apimties išsamios modelių statistinės analizės, tačiau pažymima, kad eksperimento planas buvo sudarytas analogiškai TO hidrolizės eksperimento planui. Modeliai analizuoti pagal ANOVA, modelių analizė ir reikšmingų veiksnių atranka vykdyti pagal metodologijoje numatytas rekomendacijas.

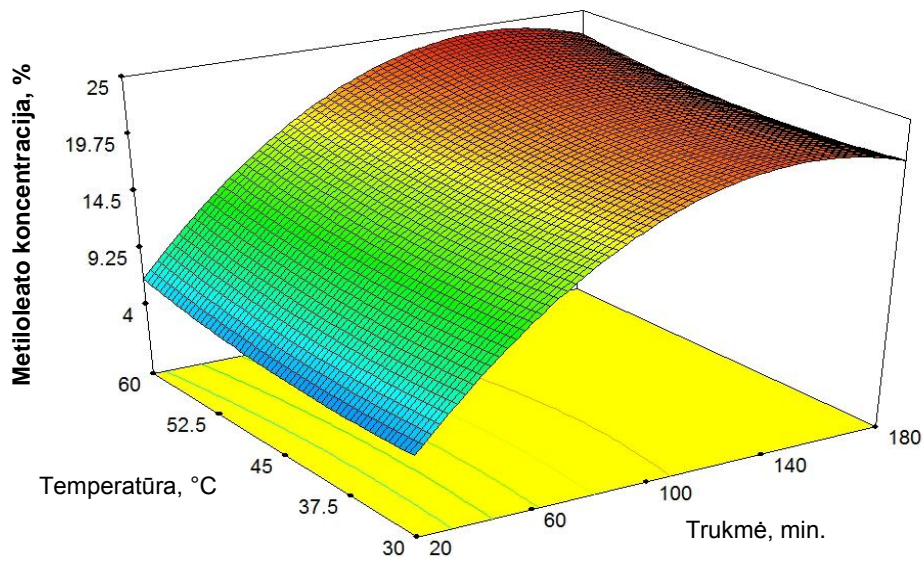
Gautos statistiškai reikšmingos funkcijos Palatase fermentui TO ir metiloleato atsakams (3.7 lentelė). Pateikti dviejų svarbiausių priklausomų kintamųjų modeliai metiloleato (MeO) - 3.17 pav. ir TO - 3.18 pav. MeO susidarymas beveik nepriklauso nuo reakcijos temperatūros, o trioleinas šiek

тік greičiau skaldomas aukštesnėje temperatūroje (atitinka trioleino hidrolizės rezultatus (3.2.1 skyrius), ypač reakcijos pradžioje.

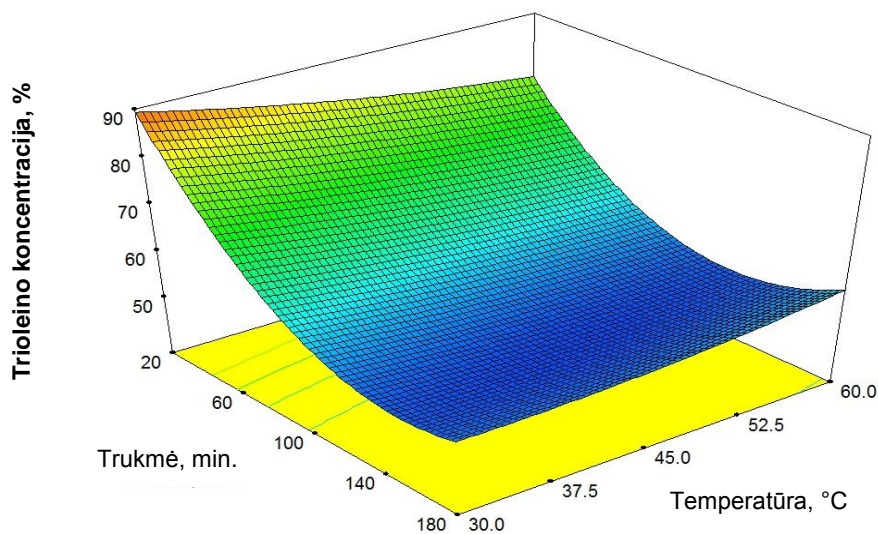
3.7 lentelė. Modelinių lygčių koeficientai, išreikšti realiai stebimomis vertėmis

Atsakas	Lygties narys				
	Laisvasis narys	A (trukmė)	B (temperatūra)	$AB \cdot 10^{-3}$	$A^2 \cdot 10^{-3}$
$Y_{1Pal}$	+116,16	-0,77	-0,50	+3,66	+2,17
$Y_{2Pal}$	-4,34	+0,35	+0,07	-0,14	-1,17

$Y_{1Pal}$ , TO koncentracijos modelis po reakcijos su Palatase,  $Y_{2Pal}$ , metiloleato koncentracijos modelis po reakcijos su Palatase.



3.17 pav. TO peresterinimo reakcijos metiloleato koncentracijos modelis, fermentas – Palatase



3.18 pav. TO peresterinimo reakcijos TO koncentracijos modelis, fermentas - Palatase



Naudojant Lecitase, Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG fermentus peresterinimo išeišos buvo per mažos (MeO išeiša atitinkamai iki 11 %, 2 %, 10 %), tokioms mažoms atsako vertėms nebuvo įmanoma sudaryti reikšmingų APM modelių. Taigi nors Lecitase ir Lipopan fermentų preparatus galima naudoti TO hidrolizei, peresterinimo reakcijai šiomis sąlygomis heksane šie fermentai per mažai aktyvūs. Taigi tirtų fermentų aktyvumo hidrolizės reakcijai katalizuoti rezultatais negalima tiesiogiai remtis, norint juos naudoti sintezės reakcijai.

**Optimizavimas.** Norint rasti optimalias sąlygas TO peresterinimui metanoliu heksane buvo vykdomas optimizavimo algoritmas, pasirinkti kriterijai pateikti P.6 lentelėje. Pagrindinis tikslas, kaip ir hidrolizės atveju, buvo gauti didelę produkto koncentraciją, tuo pačiu teikiant pirmenybę reakcijoms, vykstančioms greičiau ir žemesnėse temperatūrose, kuriose sunaudojama daugiau substrato. Siūlomi optimizavimo sprendiniai pateikti 3.8 lentelėje. Pirmasis sprendinys atitiko 143,5 min. reakciją 30 °C temperatūroje, ją pakartojus keturis kartus gauti rezultatai: 26,4 % MeO, 44,2 % TO, taigi rezultatai atitiko prognozuojamas vertes (pateko į PI<sub>95</sub> %, kuris MeO buvo 18.31 - 27.56 %, o TO 40.46 - 62.97 %).

3.8 lentelė. TO peresterinimo reakcijos optimizavimo sprendiniai

Sprendinio nr.	Trukmė	Temperatūra, °C	MeO, %	TO, %	Trokštamumas
1	143,50	30,00	22,93	51,71	0,921
2	142,53	55,92	23,65	51,41	0,919

Taigi Palatase fermentas APM duomenimis peresterinimo reakcijai tinkamas naudoti tiek esant 30 °C, tiek esant 60 °C temperatūrai (hidrolizės reakcijos optimalūs siūlomi sprendiniai esant 50 °C temperatūrai). Abiem atvejais siūloma reakcijos trukmė panaši (apie 140 min.), panaši ir likusio trioleino koncentracija (40,4 % hidrolizės, 44,2 % peresterinimo metu). Palatase atveju galima sutikti su Mustranta teiginiu, kad lipolizinis aktyvumas dažnai koreliuoja su sintetiniu [239], tačiau Lecitase, Lipopan 50 BG nors ir

pasižymėjo tam tikru lipoliziniu aktyvumu, sintezės reakcijų atveju buvo menkai aktyvūs.

Skyriaus išvados

1. Ištyrus keturių fermentų galimybes hidrolizuoti trioleiną ir transesterinti trioleiną metanoliu heksane, Palatase (RML) buvo efektyviausias fermentas. Lecitase, Lipopan F BG ir Lipopan 50 BG fermentų preparatai, nors ir katalizavo hidrolizės reakciją, peresterinimo reakcijų metu buvo mažai aktyvūs.
2. Atlikus skaitinį reakcijos sąlygų optimizavimą, nustatytos optimalios reakcijos sąlygos – fermentas Palatase (11 %), 50.5 °C 139 min., kurioms esant gauta 38,9 % oleino rūgšties ir hidrolizuota 59,6 % trioleino.
3. Optimalios nustatytos transesterinimo reakcijos sąlygos buvo 143,5 min. trukmės reakcija 30 °C temperatūroje, naudojant Palatase, kurioms esant gauta 26,4 % metiloleato, likę 44,2 % trioleino. Panašios išėigos prognozuojamos ir esant 60 °C.

### ***3.3 Biodyzelino sintezė iš linų sėmenų aliejaus ir kiaulių taukų mišinio***

Biodegalų sintezei tiriami įvairūs riebalų rūgščių gamtiniai šaltiniai. Augaliniai aliejai yra ypač populiarus pasirinkimas dėl tinkamų gaunamo produkto – biodyzelino – cheminių ir fizinių savybių – klampumo, lydymosi temperatūros, jodo skaičiaus, peroksidų kiekio. Jodo skaičius parodo aliejaus nesotumo laipsnį. Didelę dalį nesočiųjų RR turintis biodyzelinas yra mažiau klampus, žemesnėje temperatūroje drumsčiasi ir užšąla, dėl to jis tinkamesnis naudoti šalto klimato sąlygomis. Tačiau tokie degalai lengviau oksiduojasi, turi mažesnę cetano skaičių ir mažesnę šilumingumą [163]. Vienas dažniausiai naudojamų būdų reikiams biodyzelino savybėms gauti yra atitinkamos žaliavos (riebalų rūšies) parinkimas. Alternatyvus sprendimas galėtų būti skirtingų savybių riebalų mišinio naudojimas. Įvairių riebalų RR sudėtis pateikta literatūros dalyje, 57 psl. 1.6 lentelėje.

Aleksandro Stulginskio universitete buvo nustatyta, kad linų sėmenų aliejaus (LSA) ir kiaulių taukų (KT) mišinys yra alternatyva augaliniam aliejui, nes LSA, turintis didelę dalį nesočiųjų RR kompensuoja didelę dalį sočiųjų RR turinčių kiaulių taukų savybes, o LSA ir KT santykis mišinyje 68:32 (m:m) yra optimalus [246].

Fermentai, kuriais galėtų būti katalizuojama biodyzelino gamyba iš šių šaltinių, turėtų būti ne tik aktyvūs sintezės reakcijoje, bet ir nespecifiški RR grandinės ilgiui ir nesotumo laipsniui, tam kad visos RR būtų peresterinamos daugmaž vienodu greičiu.

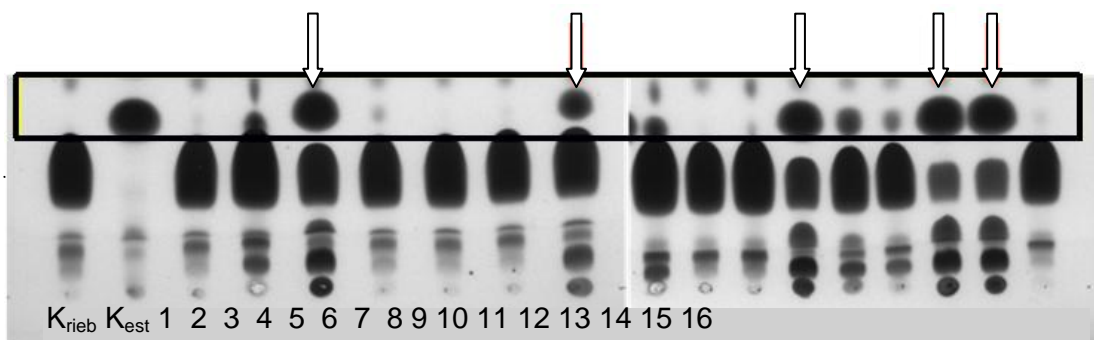
Įprastinis biodyzelinas gaminamas aliejų peresterinant metanoliu, gaunamu iš gamtinių dujų, todėl jo žaliavų sudėtyje ir galutiniame produkte apie 11 % sudaro mineraliniai ištekuliai. Norėdami reakcijai naudoti visas atsinaujinančias žaliavas, įprastinį metanolį pakeitėme etanoliu, paprastai gaminamu iš grūdų, be to fermentų atrankai ir sintezės reakcijai pasirinkta reakcijos sistema be tirpiklio, kuri yra tinkamesnė pramoniniam taikymui.

### 3.3.1 Fermentų atranka

Buvo nuspręsta iš laboratorijoje turimų Novozymes© fermentų asortimento atsirinkti tinkamiausius fermentus, išbandant tiek skystus, tiek imobilizuotus/sausus fermentų preparatus (3.9 lentelė).

3.9 lentelė. Fermentai, naudoti biodyzelino sintezės iš KT ir LSA mišinio, atrankai, numeracija atitinka fermentų numerius 3.19 pav.

	Imobilizuoti/sausi		Skysti
1	Lipex 100 T	11	Lipozyme TL 100 L
2	Novozym 435 FG	12	Lipex 100 L
3	Lipozyme TL IM	13	Palatase 20000 L
4	Lipopan 50 BG	14	Lipolase 100 L EX
5	Lipopan F BG	15	Resinase A2X
6	Lipolase 100 T	16	Lecitase Ultra
7	Lipozyme RM IM		
8	Novozym 435		
9	Lipoclean 2000 T		
10	Lipoprim 50 T		



3.19 pav. Fermentų atrankos LSA ir KT mišinio peresterinimui etanoliu reakcijos po 3 val. chromatografinis vaizdas. Fermentų numeriai atitinka fermentų numeraciją 3.9 lentelėje.  $K_{rieb}$  – riebalų,  $K_{est}$  - esterių kontrolinės dėmės

Geriausiai peresterinimą vykdė šie fermentai: imobilizuoti Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* lipazė), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei* lipazė) bei skysti Lipozyme TL 100 L, Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* lipazės preparatai) ir Resinase A2X (*Thermomyces lanuginosus* lipazė) 3.19 pav. Taigi atlikus fermentų atranką paaiškėjo, kad lipazių, kurias efektyviai būtų galima taikyti biotechnologinėms reakcijoms šaltinių įvairovė yra ribota, tai sutampa su literatūroje vyraujančia nuomone [21], be to, peresterinimo reakcijos efektyvumas dažnu atveju nesutampa su hidrolizės reakcijos efektyvumu. Pavyzdžiui, labai aktyvūs hidrolizuojant *p*-NPB fermentai Lipopan 50 BG, Lipopan F BG, Lipoclean 2000 T Lipoprime 50 T (2.1 lentelė), buvo neaktyvūs KT ir LSA mišinio peresterinime. Ir atvirkščiai – hidrolizės atveju sąlyginai mažiau aktyvūs fermentai (Lipozyme TL 100 L, Lipozyme RM IM) pasižymėjo labai geru peresterinimo aktyvumu. Detalesniam tyrimui ir optimalių reakcijos sąlygų nustatymui APM metodu pasirinkti trys įdomiausi fermentų preparatai: Lipolase 100 L (EX), Resinase A2X ir Lipozyme RM IM.

### 3.3.2 Atsako paviršiaus metodologijos taikymas

Temperatūros, reakcijos trukmės, fermento ir alkoholio koncentracijų įtakai įvertinti pasirinkome D-optimalų APM eksperimento planą. LSA ir KT mišinio peresterinimas etanoliu buvo tiriamas kiekvieno fermento atveju atskirai, 1–8 val. trukmės intervale, 30–60 °C temperatūros intervale, esant lipazės koncentracijai 3–10 % (v/v arba m/v reakcijos mišinyje), ir esant

alkoholio:triglicerido moliniam santykiui 4–6. Eksperimento planas, taikytas kiekvieno fermento tyrimui, pateiktas P.7 lentelėje. Buvo matuoti trys priklausomų kintamųjų atsakai: RR etilo esterių koncentracija, likutinė triacilglicerolių koncentracija bei mono- ir diacilglicerolių suminė koncentracija. Esterių santykinė koncentracija išreiškiama RR dalimi esančia esterių sudėtyje, lyginant su visomis reakcijos mišinyje esančiomis RR (%). Esant keturiems nepriklausomiems kintamiesiems ir trims atsakams, atsako paviršiaus grafikų skaičius yra labai didelis, todėl bus pateikti tik patys svarbiausi grafikai, skirti pavaizduoti bendroms tendencijoms t.y. vaizduojant dviejų kintamųjų įtaką, bus parinktos vidutinės likusių dviejų kintamųjų vertės ir gilinamasi tik į produkto (RR esterių) koncentracijos modelius.

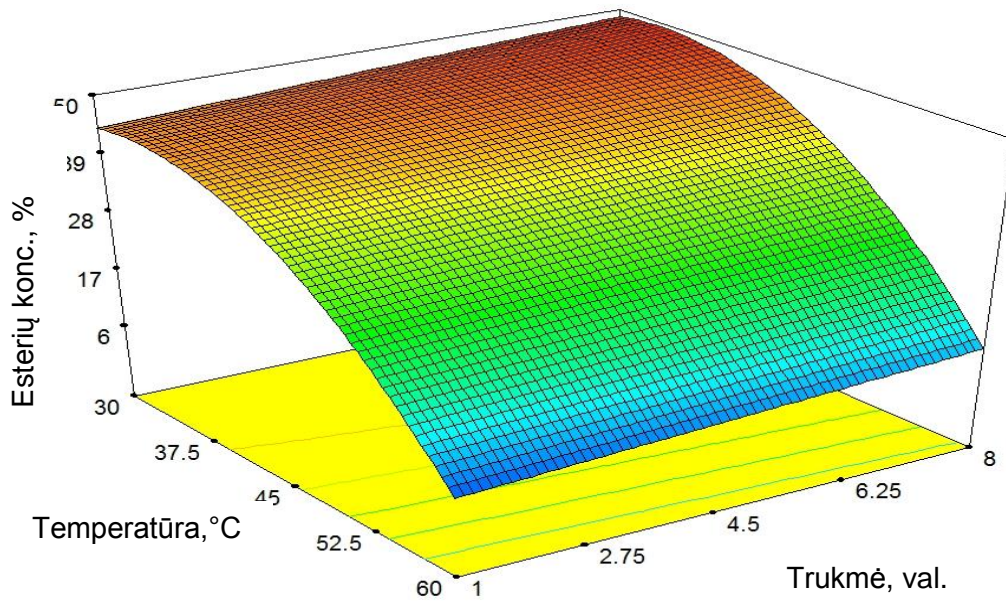
### 3.3.2.1 *Lipolase 100 L (EX) fermentas*

Atlikus reakciją su Lipolase 100 L (EX) fermentu ir redukavus modelį gauta kvadratinė esterių koncentracijos modelio lygtis (3.10 lentelė).

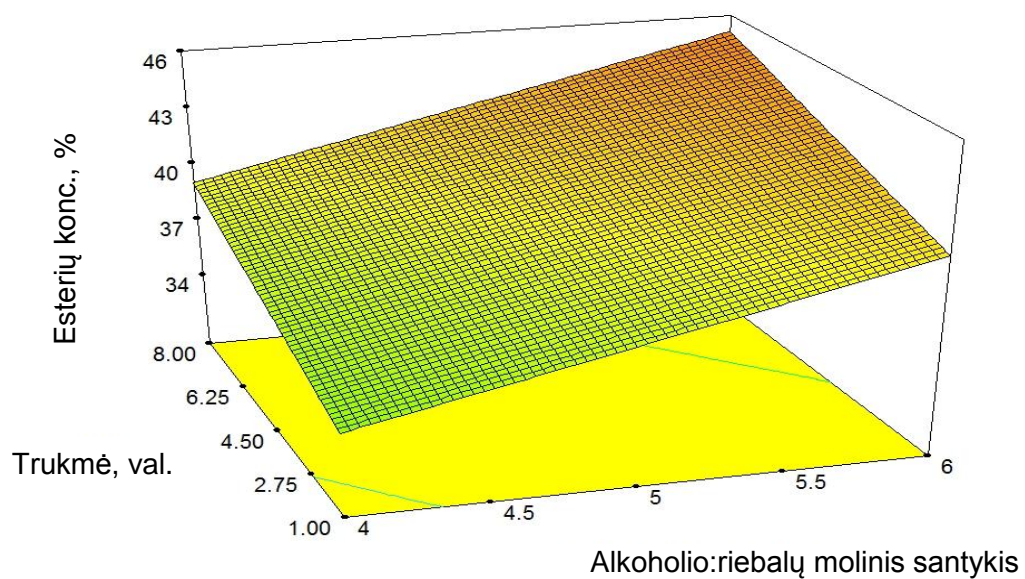
3.10 lentelė. Esterių koncentracijos modelinės lygties koeficientai realiai stebimomis vertėmis, KTA ir LSA mišinio peresterinimo etanolio reakciją katalizuojant Lipolase L (EX) fermentui.

Atsakas/Lygties narys	Koeficientai						
	Laisvasis narys	A(temperatūra)	B (trukmė)	C (lipazės konc.)	D (alkoholio:riebalų molinis santykis)	A <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
Esterių koncentracija	-59,60	+3,57	+0,67	+7,97	+3,2	-0,053	-0,542

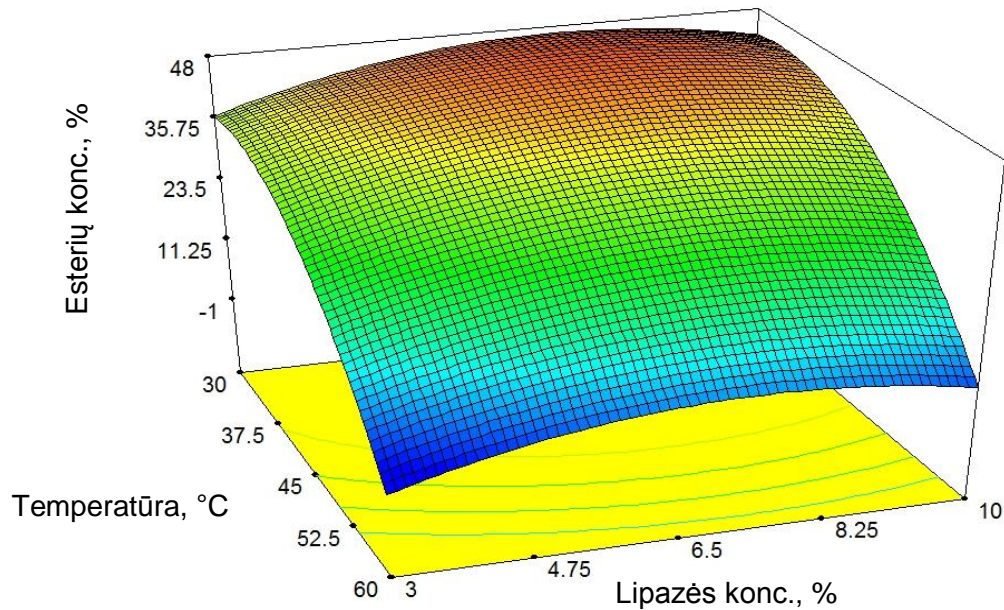
Šios lygties išraiškos pavaizduotos grafiškai 3.20–3.22 paveiksluose. RR etilo esterių susidarymui Lipolase L (EX) fermento atveju daug didesnę įtaką turi temperatūra nei reakcijos trukmė, todėl labai svarbu tinkamai parinkti reakcijos temperatūrą. Didžiausios esterių koncentracijos gaunamos mažesnių temperatūrų intervale (3.20 pav.). Didelė alkoholio koncentracija daro teigiamą įtaką nepriklausomai nuo reakcijos trukmės (3.21 pav.), ar temperatūros. Lipazės koncentracijos įtaka yra daug mažesnė, nei reakcijos temperatūros, tačiau visame temperatūrų intervale optimali lipazės koncentracija turėtų būti tarp 6,25 ir 8,5 % (3.22 pav.)



3.20 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipolase L (EX). Trukmės ir temperatūros įtaka, kai alkoholio ir riebalų molinis santykis 5, lipazės koncentracija 6,5 %.



3.21 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipolase L (EX). Trukmės ir alkoholio koncentracijos įtaka, kai temperatūra 45 °C, lipazės koncentracija 6,5 %.



3.22 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipolase L (EX). Temperatūros ir lipazės koncentracijos įtaka, kai reakcijos trukmė 4,5 val., alkoholio ir riebalų molinis santykis 5.

### 3.3.2.2 *Lipozyme RM IM fermentas*

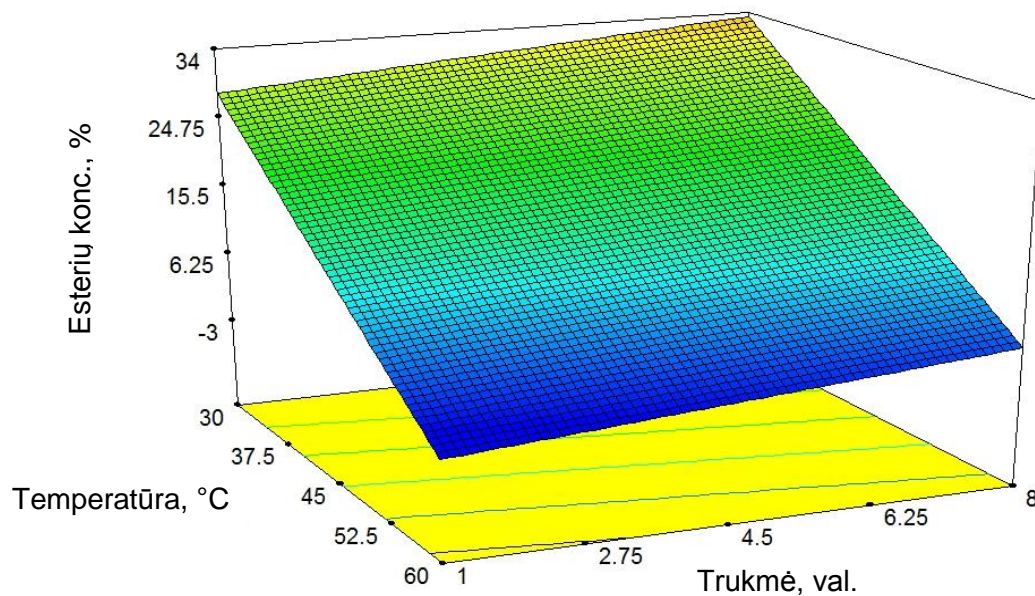
Naudojant Lipozyme RM IM fermentą LSA ir KT mišinio peresterinimui parinktas APM tiesinis modelis. Modelį aprašančios lygties koeficientai stebimomis vertėmis pateikti 3.11 lentelėje.

3.11 lentelė. Esterių koncentracijos modelinės lygties koeficientai, KTA ir LSA mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipolase L (EX) fermentui

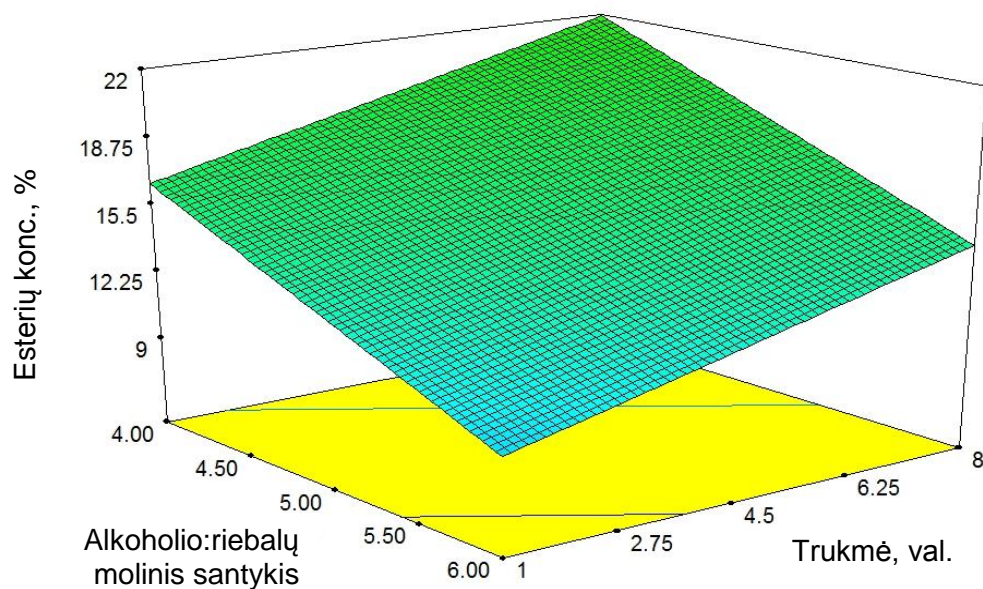
Atsakas/Lygties narys	Koeficientai				
	Laisvasis narys	A(temperatūra)	B(trukmė)	C(lipazės konc.)	D(alkoholio:riebalų molinis santykis)
Esterių koncentracija	+65,44	-1,01	+0,76	+1,61	-3,64

Lipozyme RM IM fermentinis preparatas, kaip ir Lipolase L (EX), geriau katalizuoja reakciją esant žemesnėms temperatūroms (30 °C), tačiau Lipozyme RM IM, priešingai, nei Lipolase L (EX), yra jautrus alkoholio koncentracijai ir geriausios išėigos gaunamos esant mažesnėms jo koncentracijoms (3.24, 3.25

pav.). Fermento koncentracijos didinimas, kaip ir galima būtų numanyti, turi teigiamos įtakos reakcijos išeigai (3.25 pav.).

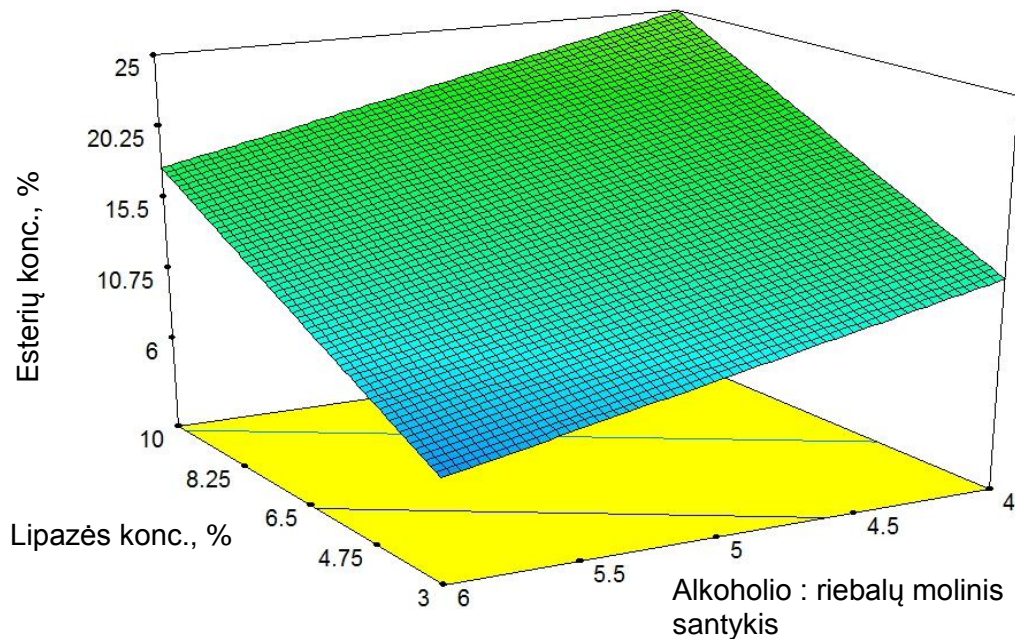


3.23 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipozyme RM IM. Temperatūros ir trukmės įtaka, kai lipazės koncentracija 6,5 %, alkoholio ir riebalų molinis santykis 5.



3.24 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipozyme RM IM. Alkoholio koncentracijos ir trukmės įtaka, kai lipazės koncentracija 6,5 %, temperatūra 45 °C.





3.25 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipozyme RM IM. Lipazės koncentracijos ir alkoholio ir riebalų molinio santykio įtaka, kai reakcijos trukmė 4,5 val, temperatūra 45 °C.

Soumanou ir kt. darbe aprašyta, kad vykdant transesterinimo reakciją heksane TLL yra aktyvesnis fermentas, nei RML, o reakcijoje be tirpiklio RML yra atsparesnis metanoliui ir ilgiau išlieka aktyvus nei TLL, kuris greitai praranda savo aktyvumą. Šiame darbe parodyta priešinga tendencija – TLL yra atsparesnis alkoholiui, nei RML. Tačiau tiesiogiai lyginti šių reakcijų negalime, nes šio darbo metu buvo naudojami kiti substratai, tame tarpe ir mažiau fermentus inaktyvuojantis alkoholis – etanolis.

### 3.3.2.3 *Resinase A2X fermentas*

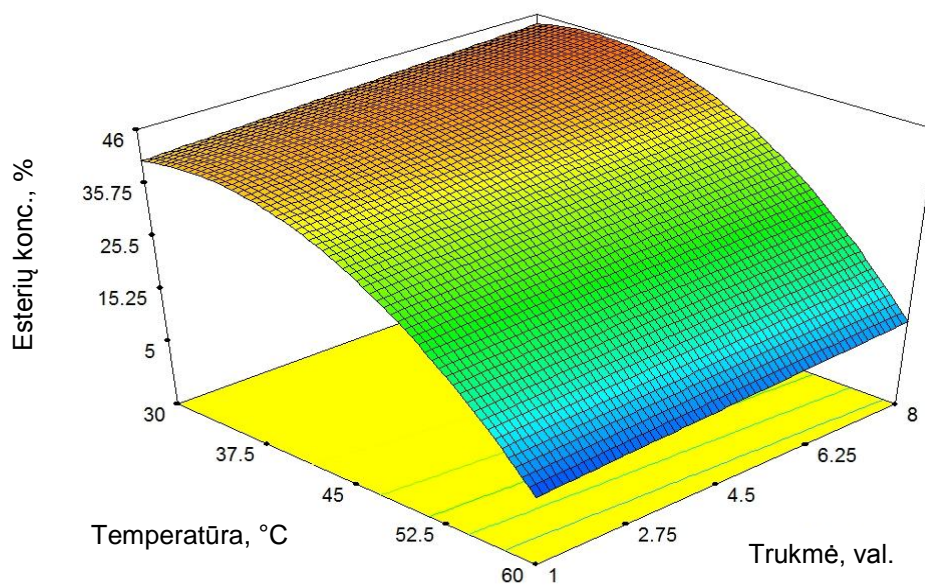
APM parinktas kvadratinis redukuotas modelis LSA ir KT mišinio peresterinimui, naudojant Resinase A2X fermentą. Modelį aprašanti lygtis (stebimomis vertėmis) pateikta 3.12 lentelėje.

Naudojant Resinase A2X fermentą, kaip ir prieš tai aprašytus Lipolase L (EX) bei Resinase A2X fermentus, labai didelės įtakos reakcijos išeigai turi reakcijos temperatūra.

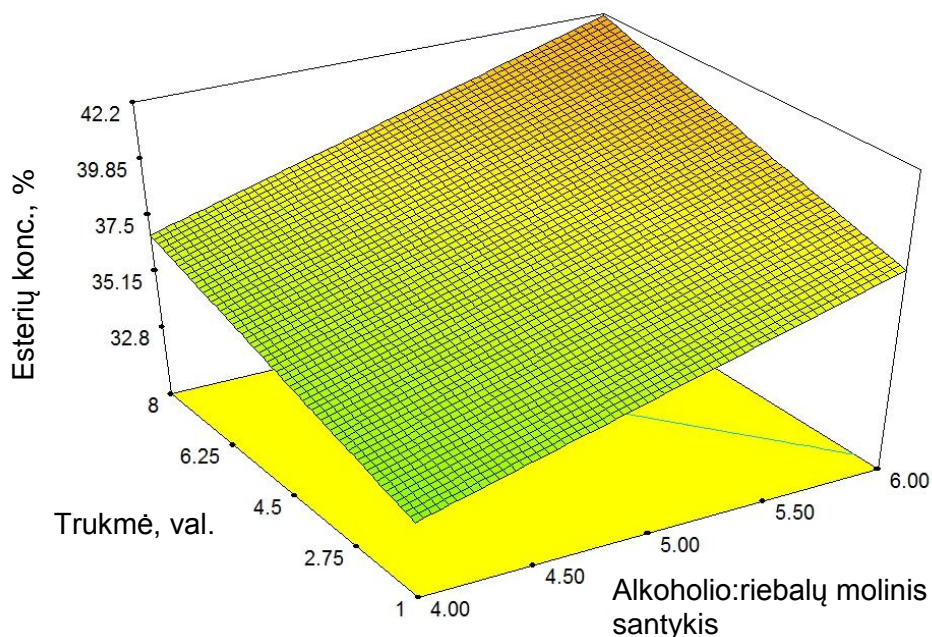
3.12 lentelė. Esterių koncentracijos modelinės lygties koeficientai, KTA ir LSA mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Lipolase L (EX) fermentui

Atsakas/Lygties narys	Koeficientai						
	Laisvasis narys	A(temperatūra)	B (trukmė)	C (lipazės konc.)	D (alkoholio:riebalų molinis santykis)	A <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
Esterių koncentracija	-66,35	+3,99	+0,55	+6,40	+2,66	-0,057	-0,401

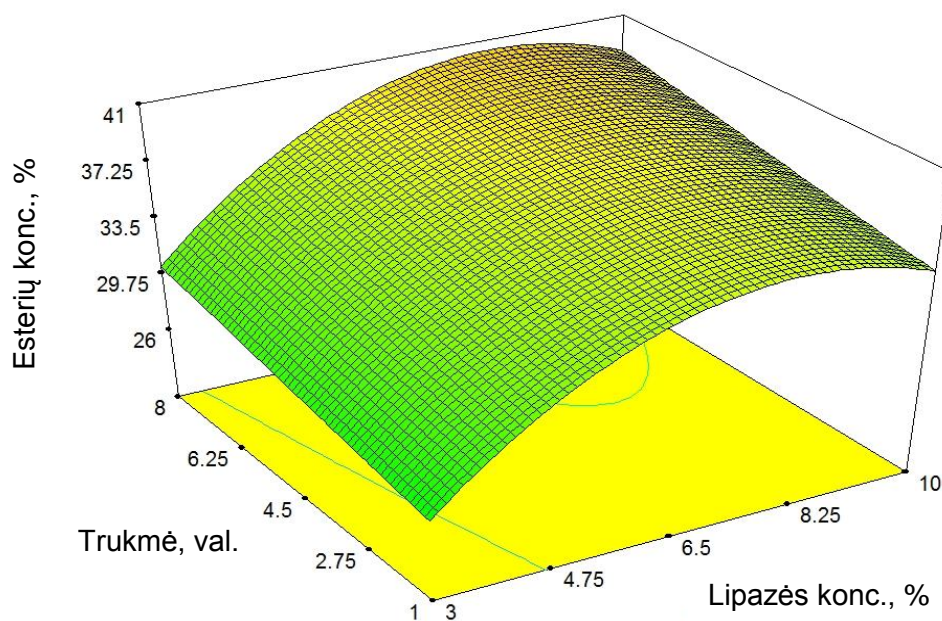
Šiuo atveju esant alkoholio : riebalų moliniam santykiui 5 ir 6,5 % lipazės koncentracijai, geriausios išeigos (iki 46 %) gaunamos 30–40 °C temperatūrų intervale, o esant 60 °C temperatūrai išeigos tesiektų 10 % (3.26 pav.). Bet kuriuo atveju reakcijos išeiga mažai priklauso nuo reakcijos trukmės, tai leidžia manyti, kad reakcija gana greitai priartėja prie pusiausvyros ir tiriamame trukmės intervale dideli esterių koncentracijos pokyčiai nėra stebimi. Naudojant Resinase A2X didėjanti alkoholio koncentracija daro teigiamą įtaką esterio susidarymui 3.27 pav. Optimali lipazės koncentracija nepriklausomai nuo reakcijos trukmės pasiekama naudojant apie 6,5–9,5 % lipazės (3.28 pav.).



3.26 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Resinase A2X fermentui. Temperatūros ir trukmės įtaka, kai lipazės koncentracija 6,5 %, alkoholio ir riebalų molinis santykis 5.



3.27 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Resinase A2X. Reakcijos trukmės ir alkoholio : riebalų santykio įtaka, kai lipazės konc. 6,5 % , temperatūra 45 °C.



3.28 pav. APM esterių koncentracijos modelis, LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakciją katalizuojant Resinase A2X. Lipazės koncentracijos ir trukmės įtaka, kai alkoholio ir riebalų molinis santykis 5, temperatūra 45 °C.

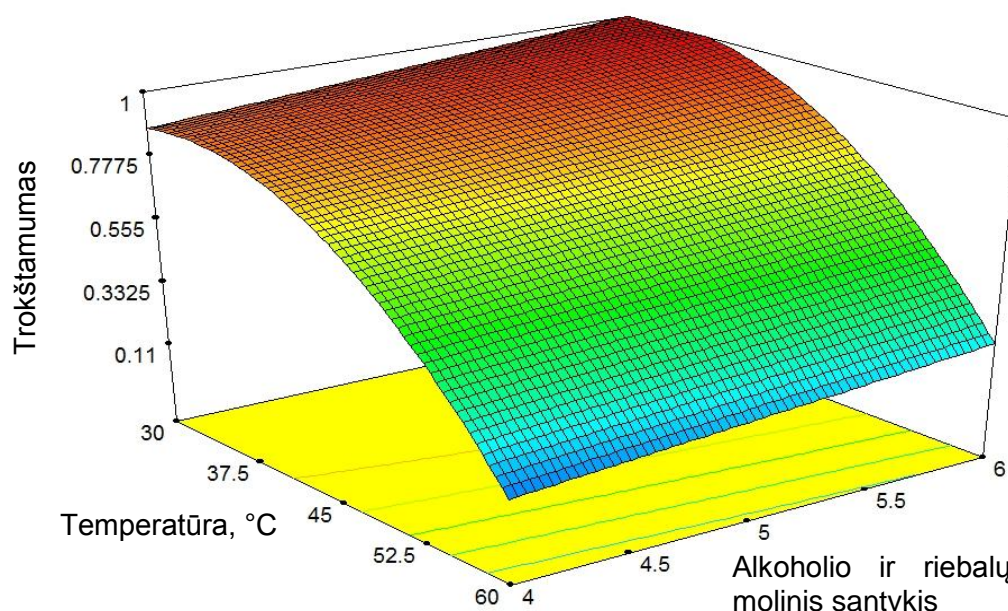
### 3.3.2.4 Optimizavimas

Siekiant rasti sąlygas, kurioms esant būtų galima gauti didžiausią RR etilo esterių išėigą, buvo atliktas proceso optimizavimas, t. y. nustatytos

nepriklausomų kintamųjų vertės, kurioms esant būtų pasiekti apibrėžti tikslai. Optimizuojant buvo siekiama maksimizuoti susidarančių esterių koncentraciją, visus kitus kintamuosius parenkant iš visos tirtos skalės. Trijų tirtų fermentų optimizavimo sprendiniai pavaizduoti P.1 lentelėje. Tirtomis sąlygomis didžiausia esterių koncentracija (52,2 %) prognozuojama naudojant Lipolase L (EX) fermentą (6,39 %) koncentracija ir alkoholio perteklių (alkoholio ir trigliceridų molinis santykis 6). Lipozyme RM IM ir Resinase A2X fermentų atveju didžiausios prognozuojamos išėigos yra atitinkamai 42,1 % ir 49,0 %. Optimizavimo sprendiniai Lipolase L (EX) fermentui, pavaizduoti grafiškai (Y ašyje trokštamumas kriterijus), pateikti 3.29 pav. Matome, kad temperatūra reakcijos išėigai turi daug didesnę įtaką, nei naudojamas alkoholio kiekis.

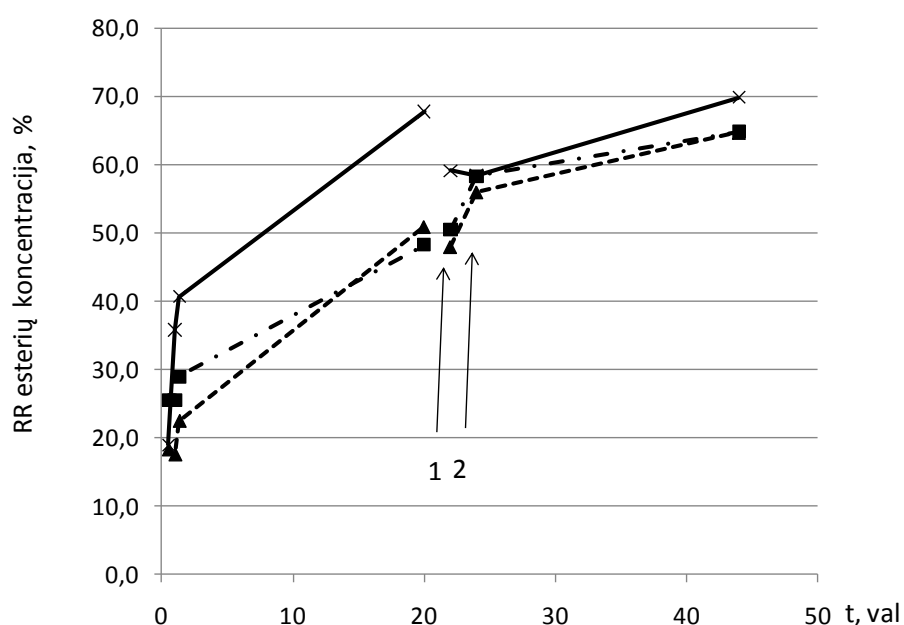
3.13 lentelė. LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu reakcijos optimizavimo algoritmo sprendiniai

Fermentas	Temperatūra, °C	Trukmė, val.	Lipazės konc., %	Alkoholio : riebalų molinis santykis	RR esterių koncentracija
Lipolase L (EX)	32,79	7,95	6,39	5,99	52,2
Lipozyme RM IM	30,01	7,25	9,97	4,00	42,1
Resinase A2X	34,76	8,00	7,99	6,00	49,0

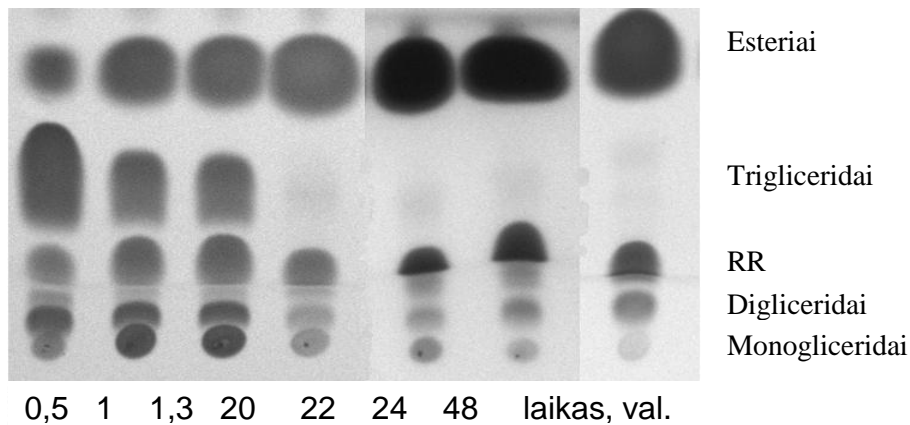


3.29 pav. LSA ir KT mišinio peresterinimo etanoliu optimizavimo sprendiniai, reakciją katalizuojant Lipolase L EX. Reakcijos temperatūros ir trukmės įtaka, kai kiti kriterijai atitinka optimalias vertes: lipazės koncentracija 6,39 %, trukmė 7,95 val.

Taigi šiomis sąlygomis naudojant du fermentinius preparatus (Lipolase L (EX) ir Resinase A2X) galima tikėtis pasiekti apie 50 % RR esterių koncentraciją, t.y. apie 50 % peresterinimo laipsnį. Tačiau toks peresterinimo laipsnis praktiniu požiūriu yra per mažas, todėl optimalių reakcijos sąlygu pagrindu buvo suplanuotas eksperimentas šalinant glicerolį iš reakcijos mišinio (taip siekiant pastumti reakcijos pusiausvyrą į produktų pusę) ir papildomai pridedant alkoholio, arba dedant alkoholį dalimis (siekiant išvengti fermento inaktyvacijos). Eksperimentui buvo pasirinktas Lipolase L EX fermentas, nes jo atveju prognozuojama didžiausia esterių išeiga, ir lyginant, su panašia išeiga pasižyminčiu Resinase A2X fermentu, reikalinga šiek tiek mažesnė lipazės koncentracija, bei šiek tiek mažesnė temperatūra. Glicerolis betirpiklėje reakcijos sistemoje sudaro atskirą fazę, dėl to jį pašalinti nėra sunku. Tačiau susiduriama su alkoholio ir fermento pašalinimo problema, nes tiek alkoholis tiek vandeninis fermento tirpalas tirpus glicerolyje. Dėl šių priežasčių į reakcijos mišinį buvo papildomami dedama alkoholio ir fermento. Šiuo būdu pavyko pasiekti apie 70 % reakcijos išeigą (3.30 pav).



3.30 pav. Reakcija optimaliomis sąlygomis (Lipolase L EX fermentas 3.13 lentelė). Šalinamas glicerolis, papildomai dedama alkoholio (1 rodyklė) ir fermento (2 rodyklė). ■ – alkoholio ir riebalų molinis santykis 6, ▲ – alkoholio ir riebalų molinis santykis 6, pridedant dalimis, × – alkoholio ir riebalų molinis santykis 10, pridedant dalimis.



3.31 pav. LSA ir KT mišinio peresterinimo reakcijos TLC atvaizdas reakciją vykdant optimaliomis sąlygomis (Lipolase L EX fermentas), papildomai dalimis pridedant alkoholio (alkoholio ir riebalų molinis santykis 10), lipazės ir šalinant glicerolį. Po takeliais pažymėta reakcijos trukmė valandomis.

Analizuojant reakcijos eigą plonasluoksnės chromatografijos atvaizduose, matome, kad trigliceridų praktiškai nebelieka po 20 val., tačiau lieka nemaža dalis kitų šalutinių produktų: monogliceridų, digliceridų ir laisvų RR. Laisvos RR šiuo atveju yra sunkiausiai paverčiamos į esterius ir per antrą reakcijos parą jų kiekis nelabai kinta. Pagrindinė priežastis, dėl kurios susidaro nemaži kiekiai hidrolizės produkto yra vandens įvedimas į mišinį su fermento preparatu (skystas preparatas), vanduo dalyvauja reakcijoje kaip acilakceptorius konkuruodamas su alkoholiu. Vienas iš šios problemos sprendimo būdų būtų imobilizuoto fermento naudojimas (pavyzdžiui, Lipozyme TL IM, kuri sudaro tos pačios TLL imobilizuotas preparatas), taip su fermento preparatu nebūtų įnešama vandens. Peresterinimo reakcijos pavyzdys, naudojant ant makroporingo polipropileno imobilizuotą TLL, bus aprašytas 3.4 skyriuje (Lipazių specifiškumo ir acilgrupės migracijos įtaka biodyzelino sintezei).

Riebalų mišiniai, įskaitant kiaulių taukų-sojų aliejaus ar kepimo aliejaus mišinius buvo tirti biodyzelino sintezėje cheminiu būdu, išeigos svyravo tarp 64 ir 89 % [247]. Taigi, disertacijoje aprašytos fermentinės katalizės efektyvumas yra panašus į cheminės katalizės, tačiau pirmoji turi tokius privalumus, kaip švelnios reakcijos sąlygos ir galimybė panaudoti neapdorotas riebalų žaliavas be papildomo laisvų riebalų rūgščių pašalinimo.

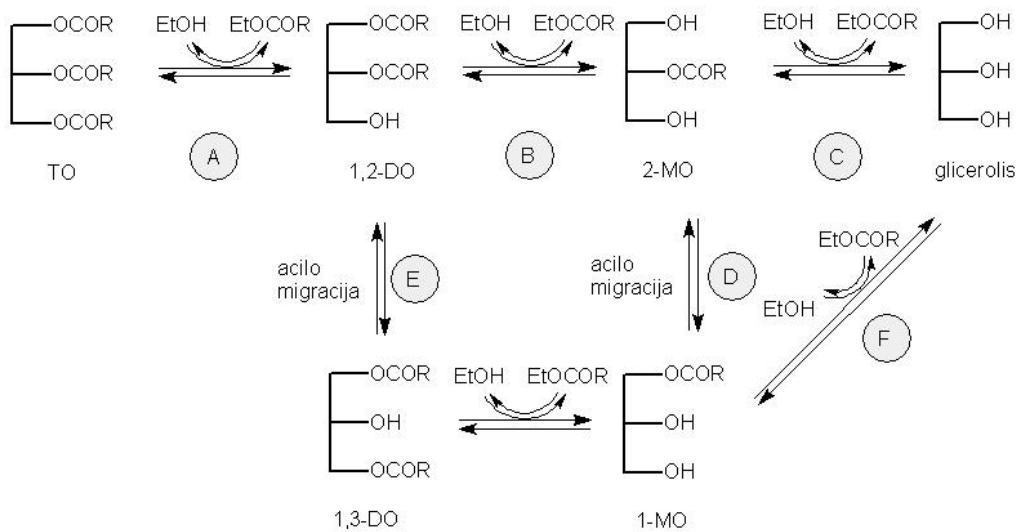
Skyriaus išvados:

1. Atrinkti fermentai, efektyviai skatinantys kiaulių taukų ir linų sėmenų aliejaus mišinio (68:32, m/m), peresterinimą etanoliu: Lipolase 100L (EX), Resinase A2X, Lipozyme TL 100 L, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM.
2. Taikant atsako paviršiaus metodologiją nustatyta peresterinimo išėigos priklausomybė nuo reakcijos trukmės, temperatūros, alkoholio bei fermento koncentracijos pasirinktiems fermentams: Lipolase 100L (EX), Resinase A2X, Lipozyme RM IM. Efektyviausias buvo Lipolase L (EX) fermentas.
3. Naudojant Lipolase 100L (EX) fermentą, pasirinkus optimalias prognozuojamas sąlygas: 33 °C, dedant alkoholio iki 10M/1M triglicerido ir papildomai šalinant reakcijos produktą bei atnaujinant fermentą, pasiekta 70 % esterių išėiga.

### ***3.4 Lipazių specifiškumo ir acilgrupės migracijos įtaka biodyzelino sintezei***

Biodyzelino sintezės metu triacilgliceroliai yra peresterinami alkoholiais, reakcijos produktai yra riebalų rūgščių esteriai ir glicerolis. Kuomet katalizei naudojama lipazė, riebalų rūgštys yra šalinamos po vieną, susidarant RR ir alkoholio esteriams ir di- bei monoacilgliceroliams, kurie toliau vykstant alkoholizei galiausiai virsta gliceroliu. Nuo lipazės specifiškumo priklauso kaip efektyviai bus peresterinamos RR skirtingose acilglicerolio padėtyse.

3.32 paveiksle parodyta lipazių katalizuojamos biodyzelino sintezės reakcijos schema su tarpinėmis stadijomis, substratais naudojant trioleiną (TO) ir etanolį. A, B, C, D ir F stadijos yra etanolizės reakcijos katalizuojamos lipazės, tuo tarpu acilgrupės migracija (toliau acilmigracija) (E ir D stadijos) nėra katalizuojamos lipazės (acilmigraciją katalizuojantys veiksniai aprašyti literatūros apžvalgoje, 1.6 skyriuje).



3.32 pav. Lipazių katalizuojamos biodyzelino sintezės reakcijos schema

Jei lipazė yra *sn*-1,3-specifinė, 2-monooleino etanolizė (C stadija) nevyksta arba vyksta labai lėtai, todėl šis etapas gali turėti „butelio kaklelio“ efektą ir būti kliūtimi įvykti pilnai alkoholizei. Katalizavus acilmigraciją (E ir D stadijas), 1,2-dioleinas virsta 1,3-dioleinu, 2-monooleinas virsta 1-monooleinu, taip C stadija gali būti apeinama ir reakciją katalizuojant 1,3-specifine lipaze gali įvykti pilna alkoholizė.

Šio tyrimų etapo tikslas buvo iširti įvairių reakcijos priedų įtaką įvairių lipazių katalizuojamai biodyzelino sintezei. Natūralių triacilglicerolių (aliejų) peresterinimo reakcijos komponentų ir produktų išsami analizė yra labai komplikauta ir nepraktiška, nes aliejų sudėtyje yra keletas skirtingų RR, be to, parcialiniai acilgliceroliai turi skirtingus regioizomerus, todėl peresterinimo reakcijos mišinyje susidaro daugybė įvairių junginių kombinacijų. Norint detaliai įsigilinti į vykstančias reakcijas racionalu naudoti paprastesnę modelinę sistemą, kurios sudėtyje būtų viena riebalų rūgštis, tai palengvina sudėtingą reakcijos produktų analizę. Pasirinkta trioleino peresterinimo etanolio reakcija. Etanolis buvo pasirinktas vietoj įprastai naudojamo metanolio, nes jis gali būti gaunamas iš atsinaujinančių šaltinių, be to etanolis mažiau inaktyvuoja fermentus nei metanolis.



### 3.4.1 Lipazių imobilizacija

Buvo pasirinktos ir ant makroporingo polipropileno Accurel MP 1000 nešiklio imobilizuotos šios lipazės:

- 1) *Aspergillus niger* (ANL)
- 2) *Candida antarctica* (CALB)
- 3) *Candida rugosa* (CRL)
- 4) *Pseudomonas fluorescens* (PFL)
- 5) *Rhizopus arrhizus* (RAL)
- 6) *Rhizopus niveus* (RNL)
- 7) *Rhizomucor miehei* (RML)
- 8) *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

Norint tirti reakcijos priedų įtaką acilgrupės migracijai, fermentas turi būti imobilizuotas ant tokio nešiklio, kurio įtaka neužgožtų stebimų reiškinių, t.y. pats nešiklis nekatalizuotų acilgrupės migracijos. Šias savybes atitinka Accurel MP 1000 nešiklis (senesnėje literatūroje rasime atitikmenį EP 1000), be to, ant šio nešiklio lipazės adsorbuojamos specifiskiau nei kiti baltymai ir nuo jo beveik neatsiplauna net vandeniniame tirpale [130, 240].

Visų fermentų atveju imobilizavimo etapas buvo tuo pačiu ir dalinis lipazės gryninimas, nes imobilizuota aktyvumo dalis yra didesnė nei imobilizuota baltymų dalis (3.14 lentelė). CALB ir TLL atveju ant nešiklio buvo adsorbuota didžioji dalis baltymų ir aktyvumo. Didelis baltymo kiekis imobilizuotas ne tik TLL, CALB bet ir RAL atveju ir yra lygus apie 38 mg/g (adsorbuota tik apie trečdalis baltymo). Lipazių imobilizacija ant poringo polipropileno buvo tirta ir anksčiau. Parodyta, kad adsorbcijos procesas gali būti aprašomas Langmuiro adsorbcijos izotermomis [240]. Nešiklį įsotinant lipazės kiekis priklauso nuo savitojo nešiklio paviršiaus ploto, kurį lemia nešiklio poringumas. Tikėtina, kad 38 mg/g vertė yra artima lipazės kiekiui, kuris įsotintų MP 1000 nešiklį [248, 249]. RML ir CRL atvejais adsorbuotas

beveik visas aktyvumas, tačiau atitinkamai tik 5 % ir 1,6 % baltymų, taigi šių lipazių preparatuose yra daug pašalinių baltymų.

3.14 lentelė. Fermentų imobilizacijos ant Accurell MP 1000 rezultatai

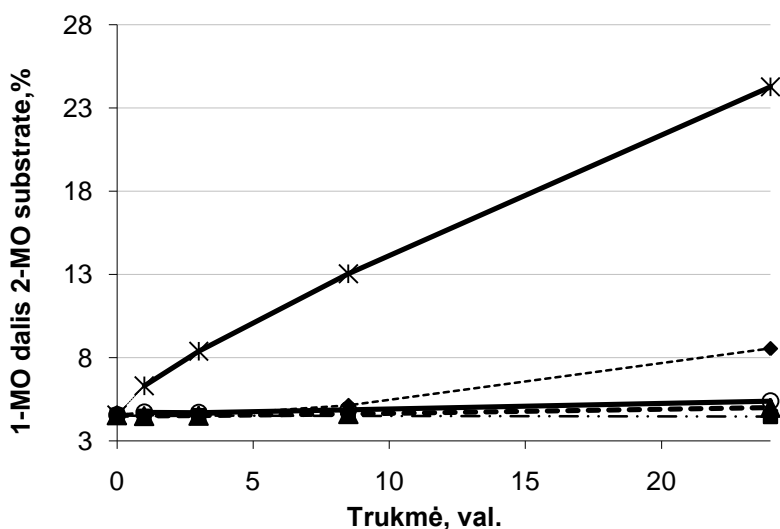
Fermentas	Imobilizuotas aktyvumas, U/g	Imobilizuotas baltymo kiekis, mg/g	Imobilizuota aktyvumo dalis, %	Imobilizuota baltymo dalis, %
ANL	1,9	0,6	67,1	9,3
CALB	128,7	36,2	94,3	91,3
CRL	375,6	0,089	94,33	1,63
PFL	136,5	15,5	83,4	58,2
RAL	155,4	37,8	63,6	35,4
RNL	2,5	14,2	83	20,9
RML	23,3	0,6	90,3	5,1
TLL	982,8	38,5	91,9	80,3

*Candida rugosa* ir *Aspergillus niger* lipazės, imobilizuotos ant Accurell MP1000, trioleino etanolizės reakcijos atveju buvo visai arba beveik neaktyvios todėl detaliau tirtos nebuvo.

### 3.4.2 Etiloleato susidarymas: reakcijos priedų įtaka skirtingų fermentų katalizuojamoms reakcijoms

Nustatyta, kad reakcijos priedai gali būti naudingi ir padidinti alkoholizės reakcijų išeigą [64, 250]. Acilmigracijos tyrimams 2-monooleino (2-MO) substrato tirpale MTBE buvo pasirinkti šie priedai: silikagelis 60 (parodyta, kad silikagelis katalizuoja acilgrupės migraciją [129]), vanduo (parodyta, kad vanduo, tirpale esant baltymų ir riebalų rūgščių, katalizuoja acilgrupės migraciją [129]), Amberlite IR 120 (H) (sulfoninių grupių turintis polistireno polimeras) ir neutralizuota jo forma, buvo tikėtasi, kad dėl savo cheminių savybių (sulfoninių grupių) jie gali katalizuoti acilmigraciją.

Nustatėme, kad geriausiai acilgrupės migraciją katalizavo silikagelis (3.33 pav.), rūgštinis Amberlite (Amberlite IR 120 (H)) taip pat šiek tiek paspartino acilgrupės migraciją, neutralus amberlite (Amberlite IR 120 (Na)) ir vanduo ( $a_w$  0,7) acilgrupės migracijos nesukėlė.



3.33 pav. Acilmigracija 2-monooleine MTBE su ir be reakcijos priedų. 1-MO dalies visame MO priklausomybė nuo trukmės. Priedai: X – silikagelis, ◆ – rūgštinis Amberlite, ▲ – vanduo, ■ – neutralus Amberlite, ○ – be priedų.

Visus priedus nusprendėme detaliau tirti pilnoje reakcijos sistemoje, kurią sudaro ne vien substrato tirpalas, bet ir fermentas, nešiklis bei susidarę reakcijos produktai, kurie gali turėti įtakos acilgrupės migracijos katalizei.

#### 3.4.2.1 Reakcijos priedų įtaka trioleino etanolizės reakcijai

Vienas iš kriterijų, pagal kurį vertinamas fermento efektyvumas, yra reakcijos išeiga, t.y. susidariusio pageidaujamo produkto koncentracija. Šiuo atveju tikslinis reakcijos produktas yra etiloleatas, todėl lyginant fermentus tarpusavyje įdomu analizuoti, kaip reakcijos priedai keičia reakcijos eigą ir kaip tai lemia etiloleato koncentracijos pokytį.

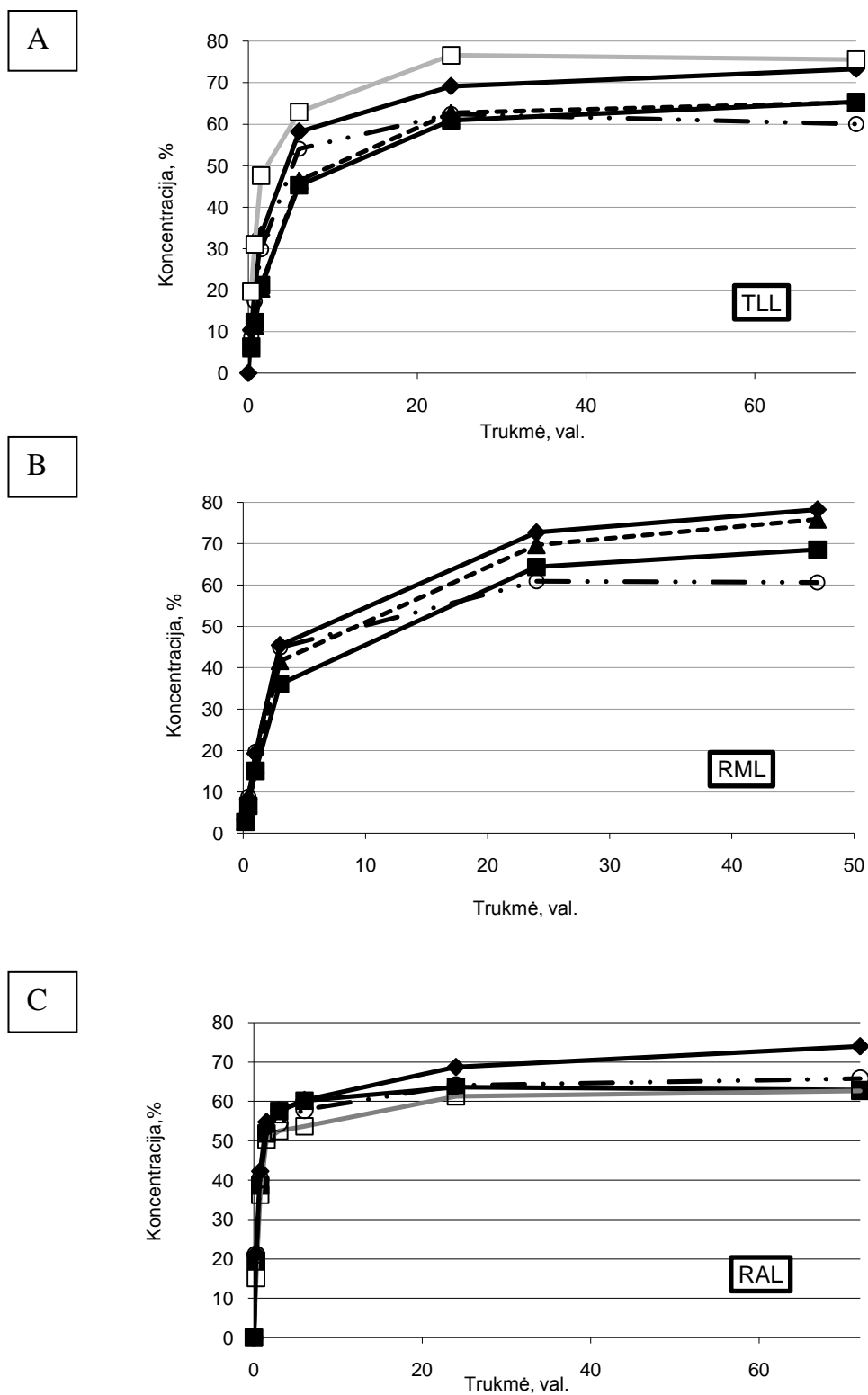
Iš esmės tirtus fermentus galima suskirstyti į dvi kategorijas: į tuos kuriems bent kai kurie reakcijos priedai padeda geriau katalizuoti trioleino peresterinimo etanoliu reakciją, tai yra TLL, RML, RAL (3.34 pav.) ir į tuos, kurių katalizei priedai daro neigiamą įtaką: CALB, PFL, RNL (3.35 pav.).

TLL atveju tiek silikagelis, tiek vanduo turėjo teigiamos įtakos reakcijos išeigai, nes po 24 reakcijos valandų santykinė etiloleato koncentracija nenaudojant priedų buvo 60,9 %, o naudojant silikagelį ir papildomai dedant vandens - atitinkamai 69,2 % ir 76,6 %. Teigiamą vandens įtaką TLL nutatyta

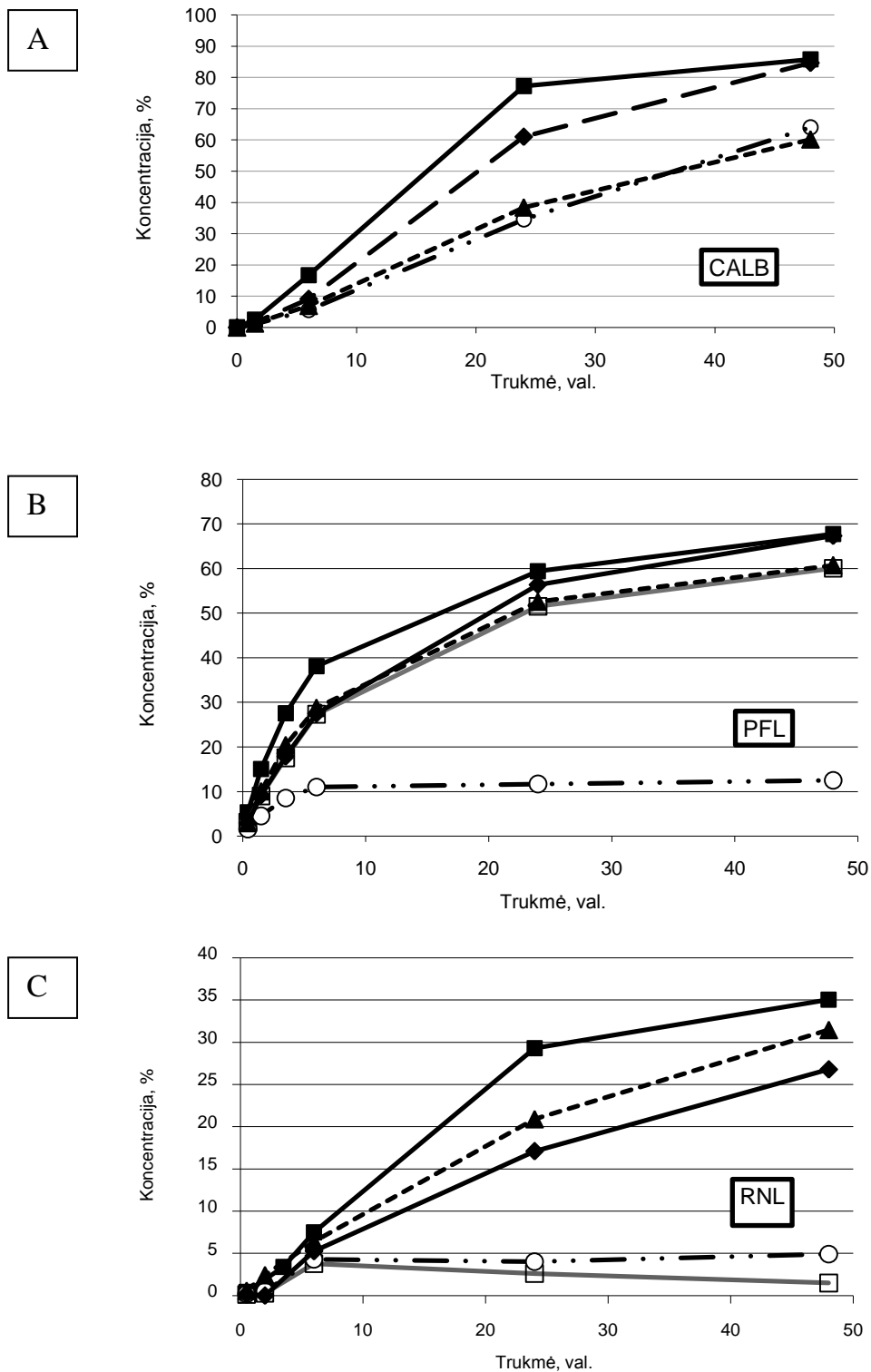
kitų tyrėjų [251, 252]. Tačiau retai atsižvelgiama į tai, kad didesnis vandens kiekis tiesiogiai proporcingas susidariusio šalutinio reakcijos produkto – oleino rūgšties kiekiui. Plačiau vandens įtaka TO etanolizės reakcijai aprašyta 3.4.4 skyriuje. Rūgštinis Amberlite paspartino reakciją tik jos pradžioje (iki 24 val.) (3.34 pav. A).

RML atveju po 24 valandų be reakcijos priedų gaunama 64,4 % etilo esterio, su silikageliu –72,74 %. Įdomu, kad tik šiuo vieninteliu atveju neutralizuotas Amberlite turi teigiamos įtakos – gaunama 69,7 % (3.34 pav. B). Teigiama vandens įtaka parodyta 3.43 pav. A dalyje. Naudojant RAL po 24 reakcijos valandų be priedų susidaro 64,0 % etiloleato ir šiuo atveju tik silikagelis gali padidinti produkto koncentraciją iki 68,7 % (3.34 pav. C).

Antrai grupei fermentų reakcijos priedai darė neigiamą įtaką: naudojant CALB be priedų po 24 val. buvo pasiekta 77,2 % santykinė etiloleato koncentracija, su silikageliu tik 61,0 %, o su abiem Amberlite - tik apie 35 % (3.35 pav. A). PFL atveju po 24 reakcijos valandų etiloleato koncentracija, gauta nenaudojant priedų (60 %) nesmarkiai skyrėsi nuo koncentracijos, naudojant silikagelį, neutralizuotą Amberlite ir vandenį, tačiau ryškią neigiamą įtaką turėjo rūgštinis Amberlite, nes šiuo atveju etiloleato koncentracija po 6 reakcijos valandų pasiekė 11 % ir daugiau praktiškai nedidėjo (3.35 pav. A). Gali būti, kad rūgštinių savybių turinti medžiaga net ir tirpiklyje denatūravo fermentą. Šią išvadą patvirtina ir tai, kad ir kitų tarpinių reakcijos junginių koncentracijos po šešių reakcijos valandų beveik nekinta (grafiniai duomenys nepateikti). Panašią neigiamą įtaką RNL turi ne tik rūgštinis Amberlite, bet ir vanduo. Jei nenaudojant reakcijos priedų po 24 valandų gaunama 29,3 % etiloleato, naudojant silikagelį ir neutralizuotą Amberlite - atitinkamai 20,9 % 17,1 %, tai naudojant rūgštinį Amberlite ir vandenį etiloleato koncentracija siekia atitinkamai vos 4,0 ir 2,6 %. Iš visų fermentų tirtomis sąlygomis didžiausia konversija buvo gauta naudojant CALB fermentą, nors pradiniai reakcijos greičiai visų kitų fermentų (išskyrus RNL) atveju akivaizdžiai didesni. Šie duomenys detaliau analizuojami 3.4.6 skyriuje.



3.34 pav. Reakcijos priedų įtaka etiloleato susidarymui trioleino peresterinimo etanoliu reakcijos metu, katalizuojant skirtingiems fermentams: A: TLL, B: RML, C: RA, reakcijos priedai: ■ – be priedų, ◆ – Silicagelis 60, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), □ – vanduo ( $a_w = 0,7$ ).

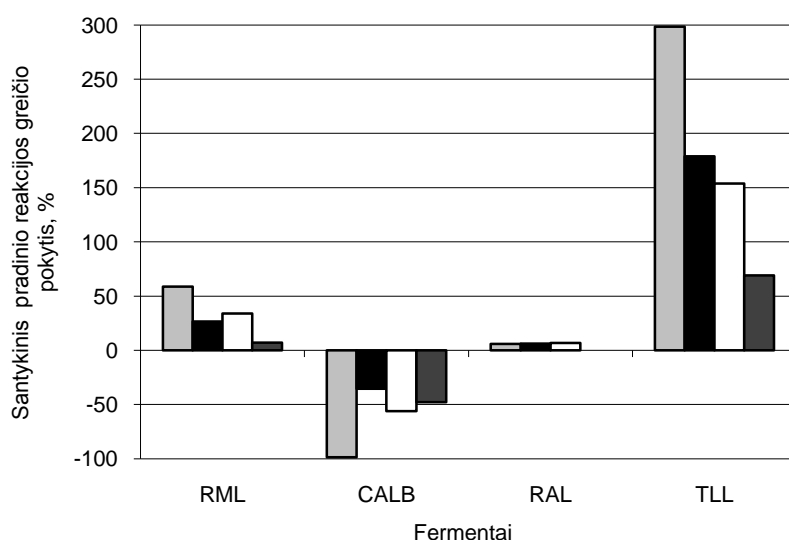


3.35 pav. Reakcijos priedų įtaka etiloleato susidarymui trioleino peresterinimo etanoliu reakcijos metu, katalizuojant skirtingiems fermentams: A: CALB, B: PFL, C: RNL, reakcijos priedai: ■ – be priedų, ◆ – Silicagelis 60, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), □ – vanduo ( $a_w = 0,7$ ).

Įdomiausi ir reikšmingiausi trioleino peresterinimo reakcijos katalizės tyrimams pasirodė keturi fermentai: TLL, RML, RAL ir CALB. Įdomu detaliau iširti silikagelio ir vandens teigiamą įtaką pirmų trijų fermentų katalizuojamai etanolizės reakcijai. Be to, RAL pasižymėjo labai greitu trioleino sunaudojimu, o CALB didesne, nei naudojant kitus fermentus, etilo esterių išėiga, todėl ir šiems faktams detalizuoti buvo būtini detalesni tyrimai.

### 3.4.2.2 Priedų įtaka pradiniam reakcijos greičiui

Jei priedų įtaką vertintume tik pagal susidariusio produkto kiekį reakcijos pabaigoje, gali likti nepastebėtas svarbus aspektas: reakcijos priedų įtaka reakcijos greičiui, pavyzdžiui, reakcijos pusiausvyra gali nepakisti, tačiau dėl greičiau vykstančios reakcijos ji gali nusistovėti anksčiau, kas technologiniam procesui yra labai svarbu, nes tai reikštų mažesnes laiko sąnaudas. 3.36 paveiksle pateikta reakcijos priedų įtaka pradiniam reakcijos greičiui (etiloleato susidarymui) ir akivaizdu, kad ji labai skirtinga. Didžiausią teigiamą įtaką tirti priedai turi pradiniam TLL katalizuojamos reakcijos greičiui, vanduo pradinį reakcijos greitį padidina 298 %, silikagelis ir rūgštinis amberlite - 179 % ir 153 %, o neutralus amberlite - 69 %.



3.36 pav. Reakcijos priedų įtaka etiloleato susidarymo pradiniam reakcijos greičiui. Y ašyje pateiktas santykinis pradinio reakcijos greičio pokytis, esant priedų, lyginant su pradiniu reakcijos greičiu be priedų. Priedai: ■ - vanduo  $a_w$  0,7, ■ - silikagelis, □ - rūgštinis Amberlite, ■ - neutralus Amberlite.

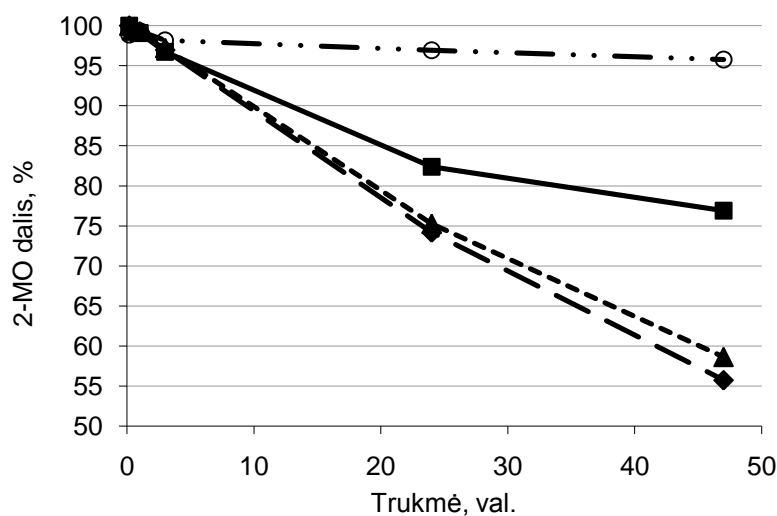
RML atveju vanduo padidina pradinį etiloleato susidarymo reakcijos greitį 59 %, kiti priedai lemia 7–33 % padidėjimą. RAL katalizuojamos reakcijos pradinis greitis beveik nepakinta (esant priedų padidėja apie 6 %), o CALB atveju pradinis reakcijos greitis sumažėja naudojant bet kurį iš priedų, ypač vandenį - sumažėjimas net 98,7 %. Naudojant Amberlite pradinis reakcijos greitis sumažėja apie 50 %. Silikagelis turi mažiausią neigiamą poveikį, nes pradinio etiloleato susidarymo greičio sumažėjimas lyginant su reakcija be priedų - 35,4 %. Kodėl visi reakcijos priedai darė neigiamą įtaką CALB aktyvumui, atsakyti sudėtinga, tačiau šiuos duomenis reikia turėti omenyje imobilizuojant šį fermentą ant naujų nešiklių – jų poveikį vertėtų iš anksto iširti, nes gali būti, kad nešiklis turės neigiamą įtaką fermento aktyvumui. Apie tai reikia žinoti ir naudojant jį biodyzelino sintezei iš riebalų, nes kai kurie ne maistinės klasės aliejai ar aliejaus atliekos (kepimui naudoti aliejai) savo sudėtyje turi gana didelį kiekį vandens, kuris gali inaktyvuoti fermentą.

#### **3.4.2.3 *Priedų įtaka monooleino izomerizacijai***

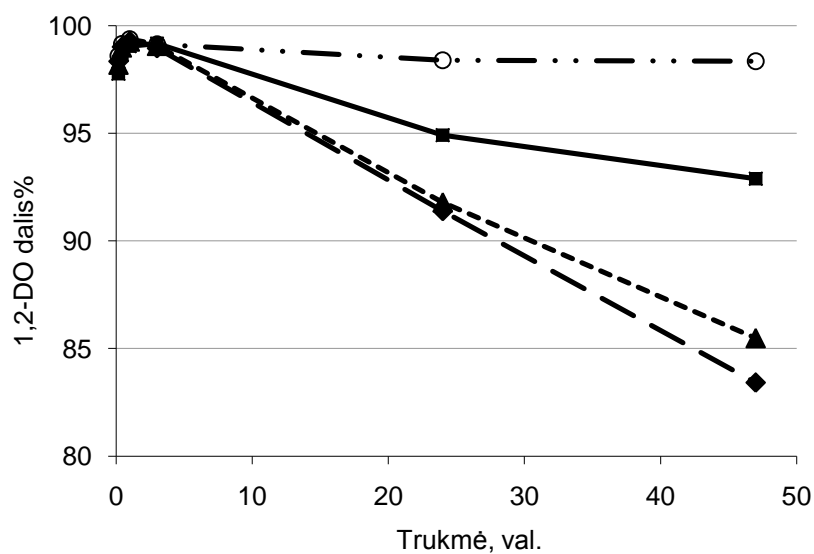
Įdomu analizuoti ne tik reakcijos priedų įtaką produktų susidarymo greičiui ir išeigai, bet ir tarpinių reakcijos junginių virsmus. Vienas įdomesnių peresterinimo reakcijos aspektų yra tarpinių junginių: dioleino ir monooleino izomerų susidarymas. Žinoma, kad 1,3-specifinės lipazės mieliau skelia jungtį prie 1 ir 3 glicerolio anglies atomų, todėl, kaip minėta, reakcijos pradžioje susidaro tik 1,2 dioleino izomeras ir 2-monooleino izomeras (3.32 pav. A ir B reakcijos). Laikui bėgant šie izomerai gali izomerizuotis į 1,3-dioleiną ir 1-monooleiną vykstant acilgurgės pernašai (3.32 pav. D, E reakcijos). 1,3-dioleinas ir 1-MO gali toliau reaguoti su alkoholiu, kai jų reakcija katalizuojama specifinių lipazių. Nustatyta, kad kiekvieno fermento atveju priedų įtaka tiek MO, tiek DO izomerizacijai buvo analogiška, skyrėsi tik izomerizacijos laipsnis. Palyginimui pateikta RML katalizuojamos reakcijos 2-MO ir 1,2-DO izomerų dalis lyginant su visu MO ir DO kiekiu (atitinkamai



3.37 ir 3.38 pav.), todėl kitų fermentų atveju bus pateikti tik 2-MO izomerizacijos duomenys.



3.37 pav. 2-MO dalis MO izomerų mišinyje priklausomai nuo trioleino etanolizės reakcijos, katalizuojamos RML, trukmės. Reakcijos priedų įtaka 2-MO izomerizacijai: ■ –be priedų, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), ◆ - silikagelis.



3.38 pav. 1,2-DO dalis DO izomerų mišinyje priklausomai nuo trioleino etanolizės reakcijos trukmės, katalizuojamos RML. Reakcijos priedų įtaka 1,2-DO izomerizacijai: ■ –be priedų, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), ◆ - silikagelis.

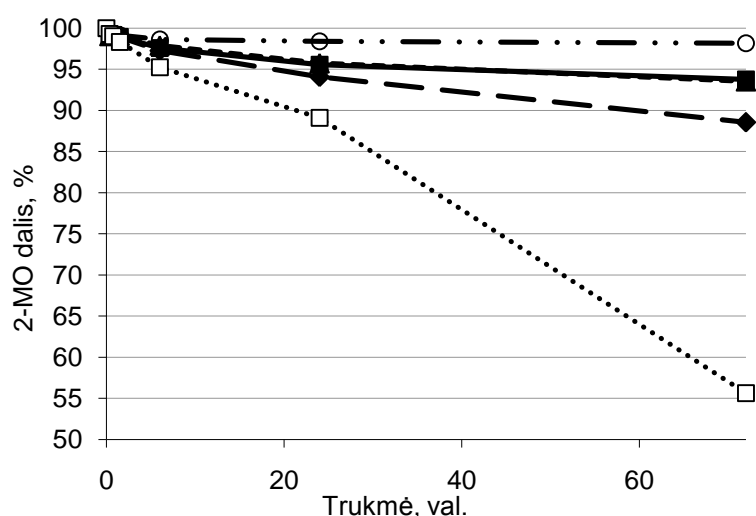
Dalinių acilglicerolių regioizomerų sudėties analizė atskleidė, kad pradinėje reakcijos pradžioje 2-MO buvo dominuojantis MO izomeras. Tai rodo, kad visos tirtos lipazės pirmenybę teikia trioleino 1 ir 3 pozicijoms. Reakcijos eigoje palaipsniui vyko konversija į stabilesnį 1-izomerą. Daugeliu

atvejų acilgrupės migracija yra pagrindinis šios izomerizacijos reakcijos mechanizmas.

Reakciją katalizuojant RML mažiausiai 2-MO MO mišinyje (apie 55 % po 48 valandų) lieka naudojant reakcijos priedą silikagelį (3.37 pav.). Šie duomenys sutampa su faktu, kad acilmigraciją geriausiai katalizuoja silikagelis (3.33 pav.), tačiau šiuo atveju, reakcijos mišinyje beveik taip pat efektyviai kaip silikagelis veikia neutralizuotas Amberlite, kuris acilmigraciją skatinančiu poveikiu gryno 2-MO tirpale nepasižymėjo. Reakcijos mišinyje nesant priedų taip pat vyksta 2-MO izomerizacija, ir po 48 valandų 77 % MO sudaro 2-MO. Sunku pasakyti, ar ši izomerizacija vyksta išskirtinai dėl reakcijos priedų ir substratų bei produktų esančių reakcijos mišinyje kompleksiskai katalizuojamos acilgrupės migracijos, ar MO izomerizuojasi vykstant neatrankiai katalizuojamai 2-MO reakcijai su etanoliu, kurios metu gaunamas etiloleatas ir jo grįžtamajai reakcijai su gliceroliu, kurios metu dėl fermento specifiškumo didesne tikimybe susidaro 1-MO (C ir F reakcijos 3.32 pav.). Keista, bet rūgštinis Amberlite efektyviai stabdo 2-MO izomerizaciją reakcijos mišinyje ir po 48 valandų 96 % MO sudaro 2-MO. Sunku pasakyti, kas lemia šį acilmigracijos slopinimą, bet akivaizdu, kad to negali lemti vien polimero cheminė struktūra, nes acilmigracijos slopinimui reikalingos rūgštinės grupės.

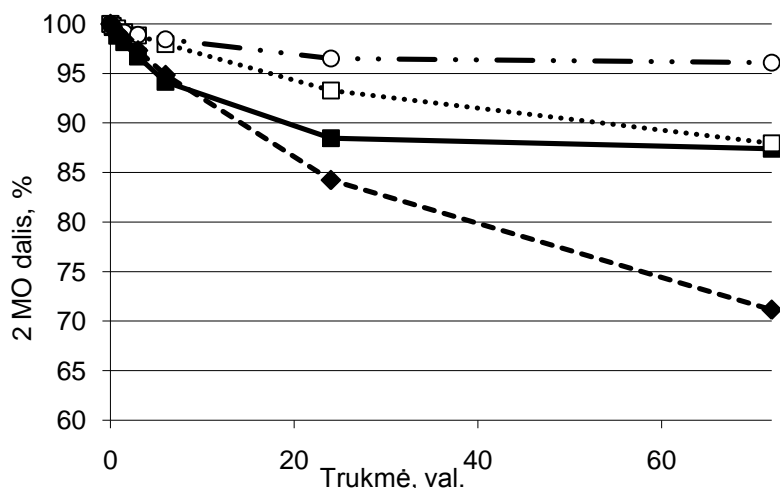
Iš esmės akivaizdus tiesinis ryšys tarp 2-MO izomerizacijos ir reakcijos išeigos (etiloleato santykinės koncentracijos): kuo efektyviau tam tikras reakcijos priedas skatina 2-MO izomerizaciją, tuo didesnė reakcijos išeiga (3.34 pav. B ir 3.37 pav.), tačiau skirtumai tarp MO izomerų sudėties daug ryškesni nei išeigos skirtumai: 40 % izomerų koncentracijos skirtumas tarp geriausiai (silikageliu) ir prasčiausiai (rūgščiu Amberlite) skatinamos izomerizacijos ir 15 % skirtumas tarp geriausios (su silikagelio priedu) ir prasčiausios (su rūgščiu Amberlite priedu) išeigos. Tai rodo, kad reakcija yra kompleksinė ir jos eigą lemia daugelis veiksnių. Vandens priedo įtaka izomerizacijai aprašyta atskirai ir parodyta 3.44 pav. A dalyje.

Reakciją katalizuojant TLL fermentui reakcijos priedų įtaka panaši, kaip ir RML fermento atveju. Rūgštinis Amberlite slopina izomerizaciją (po 72 valandų net 98 % MO sudaro 2-MO), lyginant tarpusavyje kitus kietus priedus, monooleino izomerizaciją labiausiai skatina silikagelis, neutralus Amberlite įtakos neturi (3.39 pav.). Analogiška tendencija stebima ir lyginant etiloleato santykinės išėigas: didžiausios gaunamos naudojant vandenį, mažiausios – naudojant rūgštinį amberlite (3.34 pav. A)



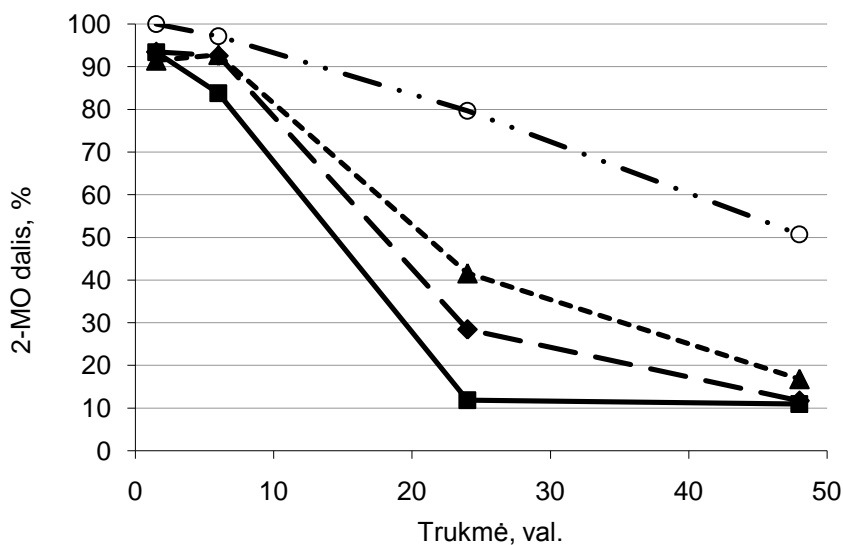
3.39 pav. 2-MO dalis MO izomerų mišinyje priklausomai nuo trioleino etanolizės reakcijos, katalizuojamos TLL, trukmės. Reakcijos priedų įtaka 2-MO izomerizacijai: ■ – be priedų, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), ◆ - silikagelis, □ – vanduo ( $a_w$  0,7).

RAL katalizuojamos etanolizės metu buvo stebima šiek tiek kitokia susidarančių MO izomerų sudėtis priklausomai nuo reakcijos priedų: vienintelis priedas silikagelis turėjo teigiamos įtakos 2-MO izomerizacijai (71 % po 72 valandų), vanduo slopino 2-MO izomerizaciją ir lyginant su reakcijos mišiniu be priedų šis slopinimas ypač efektyvus iki 24 reakcijos val. (93 % MO sudaro 2-MO), izomerizaciją taip pat slopino rūgštinis Amberlite (96 % 2-MO po 72 valandų) (3.40 pav.).



3.40 pav. 2-MO dalis MO izomerų mišinyje priklausomai nuo trioleino etanolizės reakcijos, katalizuojamos RAL, trukmės. Reakcijos priedų įtaka 2-MO izomerizacijai: ■ –be priedų, ○ – Amberlite IR 120 (H), ◆ - silikagelis, ◻ – vanduo ( $a_w$  0,7).

Vėlgi, greitesnė MO izomerizacija koreliuoja su geresne etiloleato išeiga, išskyrus tai, kad mažiausia išeiga reakcijos pradžioje gaunama dedant vandens, o ne rūgštinio Amberlite (3.34 pav. C).



3.41 pav. 2-MO dalis MO izomerų mišinyje priklausomai nuo trioleino etanolizės reakcijos, katalizuojamos CALB, trukmės. Reakcijos priedų įtaka 2-MO izomerizacijai: ■ –be priedų, ▲ – Amberlite IR 120 (Na), ○ – Amberlite IR 120 (H), ◆ - silikagelis.

Tiriant priedų įtaką reakcijos eigai, labiausiai nuo kitų fermentų skiriasi CALB. Šiuo atveju 2-MO izomerizacija vyksta labai greitai tiek su priedais, tiek be jų. Nededant jokių priedų 2-MO sudaro tik 11,8 % viso MO ir reakcijos eigoje beveik nebekinta. Tokia proporcija atitinka 2-MO ir 1-MO santykį

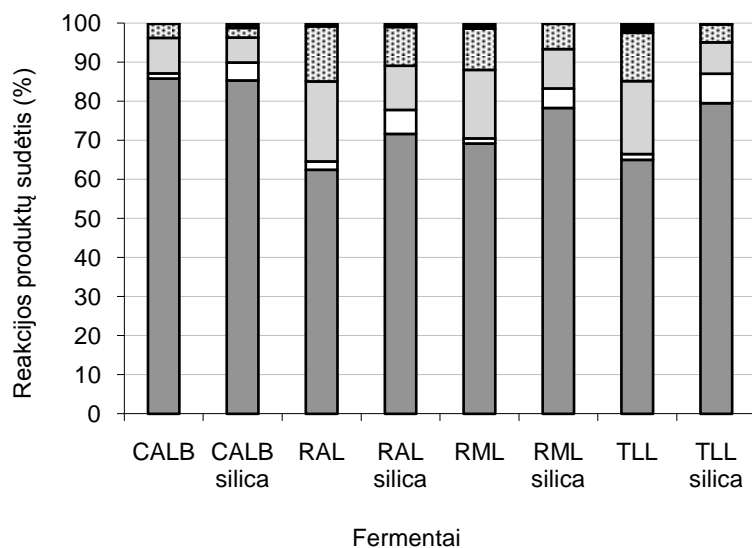
pusiausvyros būsenoje [125]. Silikagelio ir neutralaus Amberlite naudojimas, priešingai nei TLL, RML, RAL atvejais, sulėtina 2-MO izomerizaciją. Kaip ir kitų fermentų atveju, labiausiai 2-MO izomerizaciją stabdo Amberlite IR 120 (H), tačiau net ir dedant šio priedo po 48 valandų lieka tik 50 % 2-MO (kitų fermentų atveju virš 95 %). Nuo priedų priklausomas izomerizacijos greitis, kaip ir kitų fermentų atveju koreliuoja su reakcijos išeiga, išskyrus tai, kad rūgštinio Amberlite atveju izomerizacija yra daug lėtesnė, nei neutralaus, o išeigos beveik vienodos (3.35 pav.).

Taigi reakcijose, katalizuojamose TLL, RML, RAL, silikagelis žymiai padidino 2-MO izomerizacijos greitį, tačiau naudojant CALB silikagelio priedas turėjo priešingą poveikį, sulėtindamas 2-MO izomerizaciją. Reakcijos be silikagelio metu izomerizacija galėjo nusistovėti vykstant greitai fermento katalizuojamai monooleino konversijai į glicerolį ir grįžtamajam glicerolio esterinimui, kurio pagrindinis produktas yra 1-MO. Gali būti, kad CALB yra efektyvesnė nei kiti fermentai esterinant glicerolį, o silikagelis bei Amberlite yra linkę adsorbuoti polinius junginius, taip pat ir glicerolį. Dėl šios adsorbcijos galėjo sulėtėti glicerolio grįžtamasis esterinimas.

### **3.4.3 Silikagelio įtaka reakcijos eigai**

Nustatyta, kad TLL, RML ir RAL atveju silikagelis turėjo teigiamos įtakos tiek acilgrupės migracijai, tiek etiloleato susidarymui. Palyginus reakcijos produktų sudėtį po 48 valandų, didžiausia etiloleato išeiga gaunama naudojant CALB, tiek su silikageliu, tiek be jo (3.42 pav.) Matome, kad nors silikagelis ir padidina etiloleato išeigą, visų fermentų atveju padidėja susidariusios laisvos oleino rūgšties kiekis. Oleino rūgšties koncentracijos pokyčiai, priklausomai nuo reakcijos priedų, plačiau bus aprašyti 3.4.5 skyriuje. RML ir TLL atveju silikagelio priedas naudingas, nes jo dedant reakcijos mišinyje praktiškai nebelieka reakcijos substrato trioleino, o be šio priedo po 48 reakcijos valandų vis dar yra 1,4–2,4 % trioleino. Visiškas trioleino sunaudojimas yra reikalingas, norint kurį nors iš šių fermentų naudoti pradiniam trioleino etanolzės etapui, nes, kaip nustatyta (3.4.7 sk.), vykdant

reakciją etapais, po pirmojo etapo likęs trioleinas antrame etape sunkiai sunaudojamas.

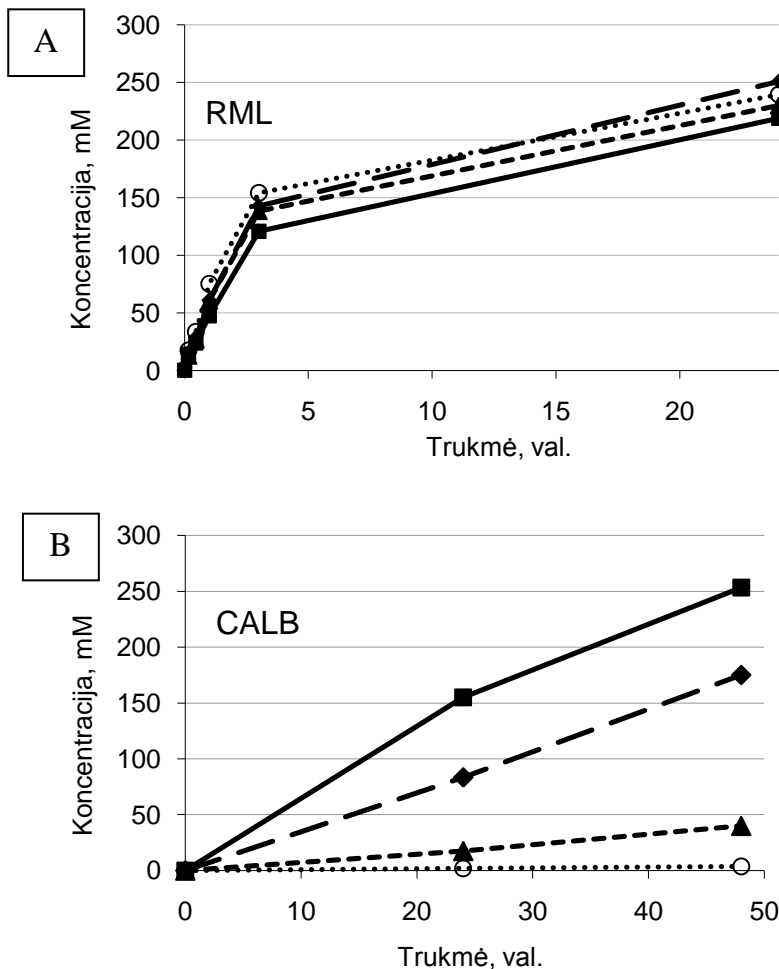


3.42 pav. Reakcijos produktų sudėtis po 48 valandų trioleino etanolizės, katalizuojamos lipazėmis su ir be silikagelio. ■ – trioleinas □ – oleino rūgštis ■ – etiloleatas. ▨ – dioleinas

### 3.4.4 Vandens įtaka reakcijos eigai

Kokia skirtinga reakcijos eigai gali būti vandens įtaka, gerai parodo RML ir CALB fermentų katalizės pavyzdžiai. Etanolizės reakcijos terpėje esant skirtingam vandens aktyvumui ( $a_w$  nuo 0,2 iki 0,7) didesnė etiloleato išeiga katalizuojant RML gauta esant daugiau vandens (nors padidėjimas nežymus, apie 10%), tuo tarpu katalizuojant CALB reakcija geriausiai vyksta bevandeniam tirpiklyje (3.43 pav.), o didinant vandens kiekį mažėja etiloleato išeiga, ir reakcija praktiškai nebevyksta esant 0,7  $a_w$ . Šių rezultatų galima buvo tikėtis, nes CALB reakcijos, geriau vykstančios terpėje be vandens, aprašytos ne vieno tyrėjo [119–121]. Įdomu, kad literatūroje aprašoma ir priešinga tendencija: tiek neimobilizuotos, tiek imobilizuotos CALB didesnis aktyvumas didėjant vandens aktyvumui [122], kai vyksta RR mišinio esterinimas 1,3-propandioliu MTBE. Autoriai teigia, kad lipazės aktyvumo priklausomybė nuo vandens aktyvumo gali kisti priklausomai nuo reakcijos tipo (esterinimas, acilgrupės pernaša), substratu naudojamu alkoholio tipo ir ant nešiklio užnešto fermento kiekio. Taigi reakcijos katalizei renkantis CALB, reikia turėti

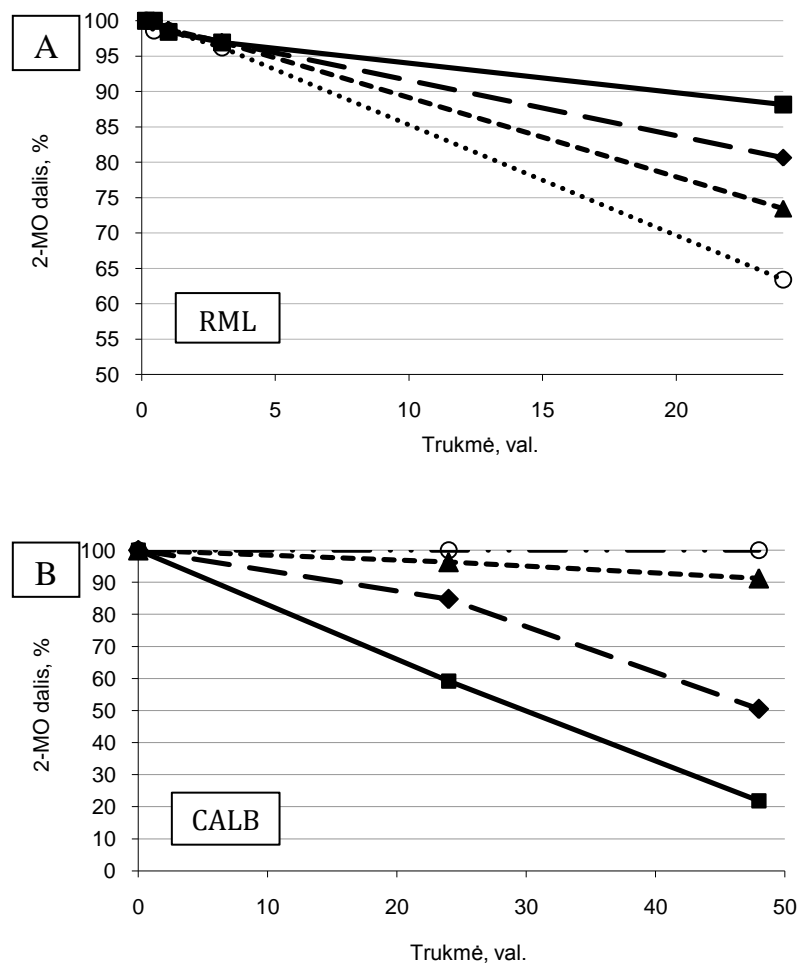
omenyje, kad šio fermento aktyvumo priklausomybė nuo vandens aktyvumo reakcijos mišinyje skiriasi, priklausomai nuo to, kokią reakciją katalizuosime ir gali drastiškai pasikeisti organinėje reakcijos terpėje esant nežymiam vandens koncentracijos pokyčiui, todėl vandens įtaką katalizei reikėtų nustatyti kiekvienos naujai tiriamos reakcijos atveju.



3.43 pav. Etiloleato koncentracijos kitimas trioleino etanolizės metu, reakciją katalizuojant RML (A) ir CALB (B) ir esant skirtingam vandens kiekiui sistemoje: ■ – bevandenis tirpiklis, ◆ –  $a_w$  0,2 ▲ –  $a_w$  0,4, ○ –  $a_w$  0,7.

Įdomių duomenų pateikiama ne tik apie vandens įtaką produktų susidarymo greičiui ir išėigai, bet ir apie tarpinių reakcijos junginių virsmus, ypač apie monooleino izomerų sudėtį. Millqvist ir kt. teigia, kad vanduo turi nevienareikšmį poveikį acilgrupės migracijai: ją slopina, jei sistema sudaryta tik iš gliceridų, tirpiklio ir vandens, bet skatina, jei sistemoje yra baltymų ar riebalų rūgščių [129]. Taigi, mano tyrimo rezultatai patvirtina Millqvist teiginį kai RML atveju buvo nustatyta ryški 2-MO dalies visame MO mišinyje

priklausomybė nuo vandens kiekio: kuo daugiau reakcijos mišinyje vandens, tuo lengviau vyksta monooleino izomerizacija. Po 24 valandų reakcijos sistemoje nesant vandens 2-MO sudaro 88 % MO, esant  $a_w$  0,7 2-MO sudaro tik 63 % MO (3.44 pav. A). Tačiau visiškai priešingą reiškinį stebime CALB atveju (3.44 pav. B), kai po 24 valandų mažiausiai 2-monooleino MO mišinyje



3.44 pav. 2-MO dalis monooleino izomerų mišinyje, priklausomai nuo reakcijos trukmės ir vandens kiekio, reakciją katalizuojant (A) RML, (B) CALB. Vandens kiekis sistemoje: ■ – sausas tirpiklis, ◆ –  $a_w$  0,2 ▲ –  $a_w$  0,4, ○ –  $a_w$  0,7.

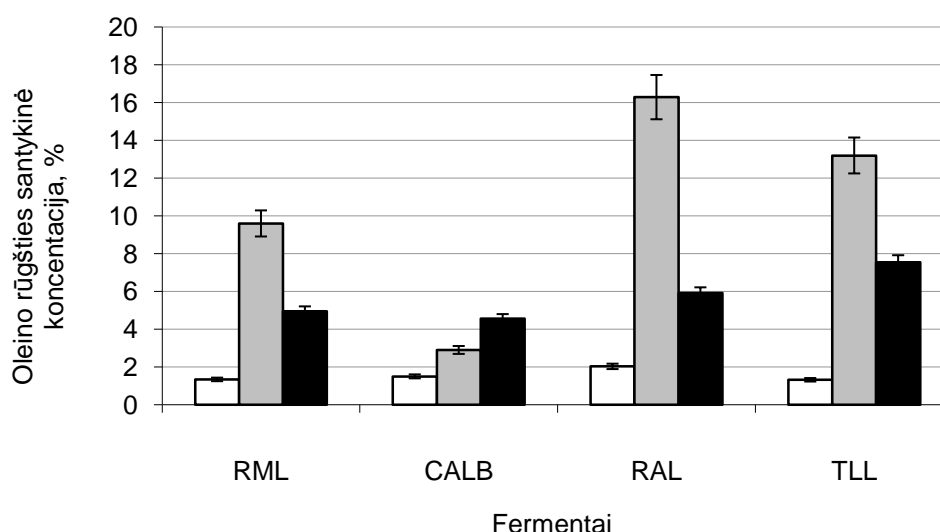
randama mišinyje be vandens (2-MO dalis 59,2 %), esant 0,4  $a_w$  2-MO sudaro 96,3 % MO, o esant 0,7  $a_w$  visą MO (kurio, beje, labai nedaug, nes esant šioms sąlygoms reakcija praktiškai nevyksta) sudaro 2-MO. Taigi šiuo atveju kuo mažiau vandens, tuo greičiau vyksta monooleino izomerizacija. Deja, abiejų fermentų atveju vien vandens poveikiu monooleino izomerizacijos paaiškinti negalime, nes vien dėl vandens priedo ši izomerizacija vyksta daug lėčiau (3.33 pav.). Tokią greitą izomerizaciją CALB (galbūt ir RML) atveju gali lemti



neatrankiai katalizuojama 2-MO reakcija su etanolu, kurios metu susidaro etiloleatas ir jo grįžtamoji reakcija su gliceroliu, kurios metu dėl fermento specifiškumo su didesne tikimybe susidaro 1-MO (reakcijos schemeje 3.32 pav. C ir F reakcijos).

### 3.4.5 Šalutinis reakcijos produktas – oleino rūgštis

TLL ir RML atveju vanduo pagreitina katalizę bei gali padidinti reakcijos išeią, tačiau analizuojant reakcijos produktus, vanduo visuomet lemia intensyvesnę hidrolizės reakciją (alternatyvus acilakceptorius, reaguojantis vietoj etanolio) ir didesnę susidariusios laisvos oleino rūgšties koncentraciją. Keista, tačiau ne tik vanduo, bet ir kitas teigiamą įtaką reakcijų su TLL, RML ir RAL išeią turintis priedas silikagelis skatina oleino rūgšties susidarymą. Reakcijos sistemoje esant vandens po 48 valandų gali būti dešimteriopai daugiau oleino rūgšties, nei reakcijoje be vandens. Pvz, kai naudotas TLL fermentas - atitinkamai 13,2 % ir 1,32 % (3.45 pav). Reakcijos terpėje esant vandens daugiausiai oleino rūgšties susidaro RAL naudojimo katalizei atveju (16,29 %), mažiausiai – CALB (2,9 %). Kaip minėta, CALB atveju vanduo negiamai veikia ir etiloleato susidarymo procesą.

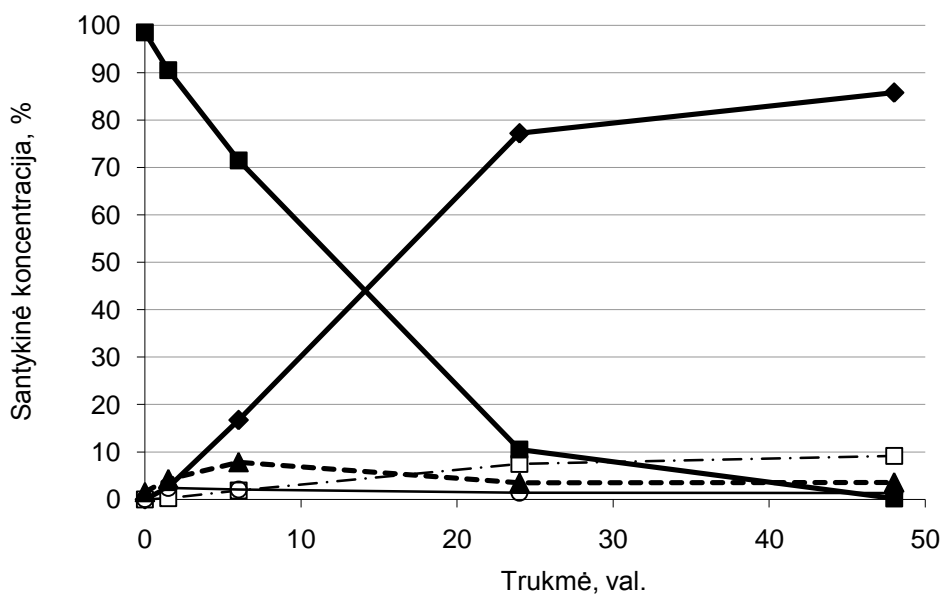


3.45 pav. Vandens ir silikagelio įtaka šalutinio reakcijos produkto – oleino rūgšties – koncentracijai po 48 reakcijos valandų. □ – reakcija be priedų, ■ – reakcija esant 0,7 a<sub>w</sub>, ■ – reakcija su silikagelio priedu.

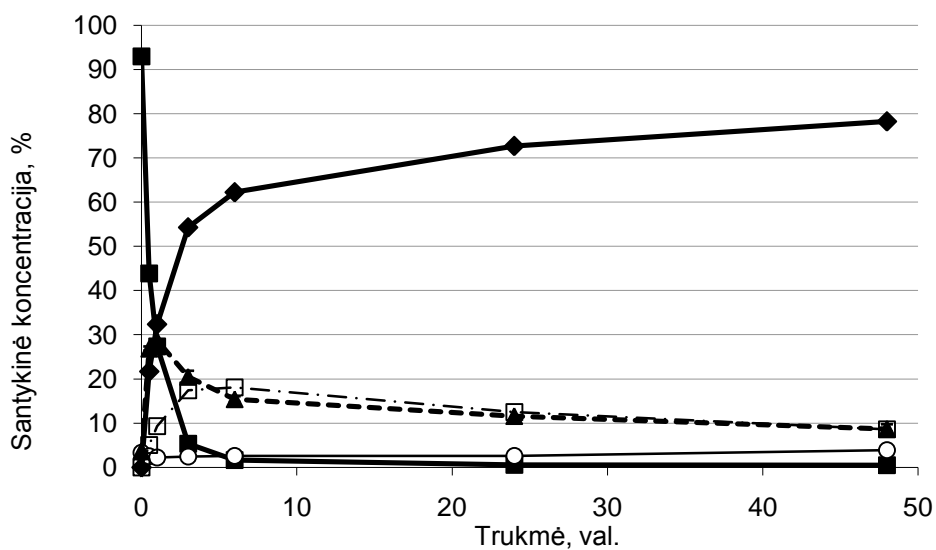
Esant silikagelio priedui, susidariusios oleino rūgšties koncentracija svyruoja nuo 4,57 iki 7,54 % (atitinkamai fermentų CALB ir TLL atveju), o be priedų - nuo 1,32 iki 2,03 (atitinkamai TLL ir RAL atveju). Kiti priedai (rūgštinis ir neutralus Amberlite taip pat lemia didesnę susidariusios oleino rūgšties koncentraciją: priklausomai nuo fermento po 48 valandų susidaro 3,5 % – 11,5 %, (grafiškai nepateikti duomenys).

#### **3.4.6 Reakcijos produktų sudėtis priklausomai nuo trukmės. Skirtingų acilglicerolių pradiniai etanolizės greičiai**

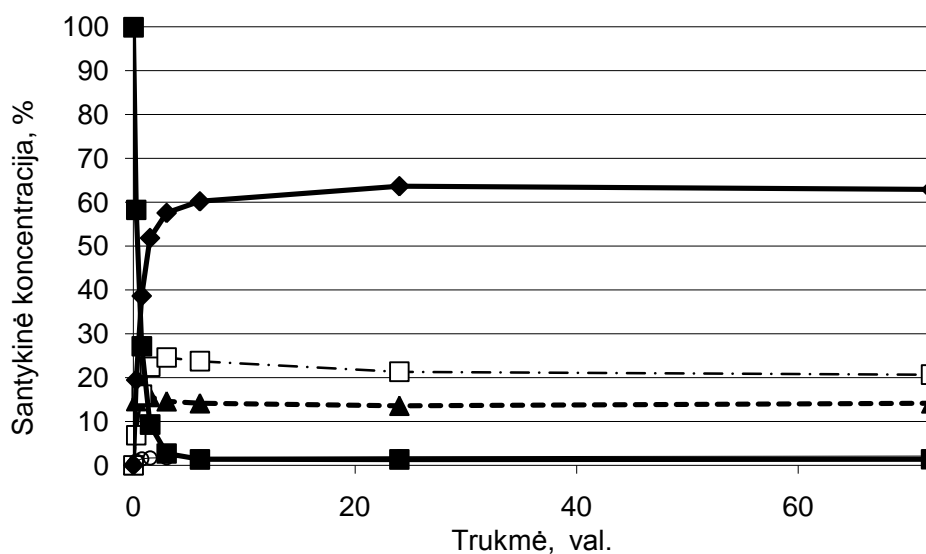
Tiriant alkoholizės reakcijų eigą matome, kad trioleino sunaudojimas yra gana lėtas, kai reakciją katalizuoja CALB, o susidarantys monooleino ir dioleino kiekiai reakcijos metu gana maži (3.46 pav.), tačiau po 48 reakcijos valandų etiloleato išeiga gana didelė. Kad pradinis reakcijos greitis yra mažas, naudojant CALB pastebėjo Hernandez ir kt., kai, norėdami gauti vienodą pradinį reakcijos greitį naudojant TLL ir CALB fermentus, turėjo naudoti 50 % CALB ir didelį etanolio perteklių, lyginant su 10 % TL IM ir ekvimoliariniu alkoholio kiekiu. Tačiau CALB pasižymėjo didesne galutine konversija [253]. Disertacinio darbo tyrimų rezultatai rodo, kad CALB konvertuoja trioleiną lėtai, o monooleiną ir dioleiną – greičiau. Renkantis tarp kitų fermentų, didžiausia etiloleato išeiga gauta naudojant TLL su silikagelio priedu. Stebimas greitas TO sunaudojimas, susidaro gana didelė MO ir DO koncentracija, kuri mažėja iš lėto. Dėl lėto MO ir DO sunaudojimo galutinė etiloleato išeiga santykinai maža (3.47 pav.). Todėl RAL pasižymi ypatingai greitu TO sunaudojimu, tačiau labai lėtai konvertuoja MO (daugiau nei 95 % sudaro 2-MO) bei DO (3.48 pav.). Ši konversija vyksta lėtai dėl labai griežto fermento 1,3-specifiškumo. RAL fermentas dėl savo specifiškumo ir reakcijos metu susidarancios santykinai didžiausios 2-MO koncentracijos (ypač reakcijos terpėje esant vandens  $a_w$  0,7) buvo panaudotas gryną 2-MO ir 1-MO sintezei. 2-MO sintetintas iš trioleino etanolizės būdu, o 1-MO sintetintas glicerolio esterinimo oleino rūgštimi būdu. Ši sintezė aprašyta metodų 2.8 skyriuje.



3.46 CALB katalizuojamos trioleino etanolizės reakcijos substratų ir produktų sudėtis priklausomai nuo reakcijos trukmės. ■ – trioleinas, ▲ – dioleinas, □ – monooleinas, ◆ – etiloleatas, ○ – oleino rūgštis.

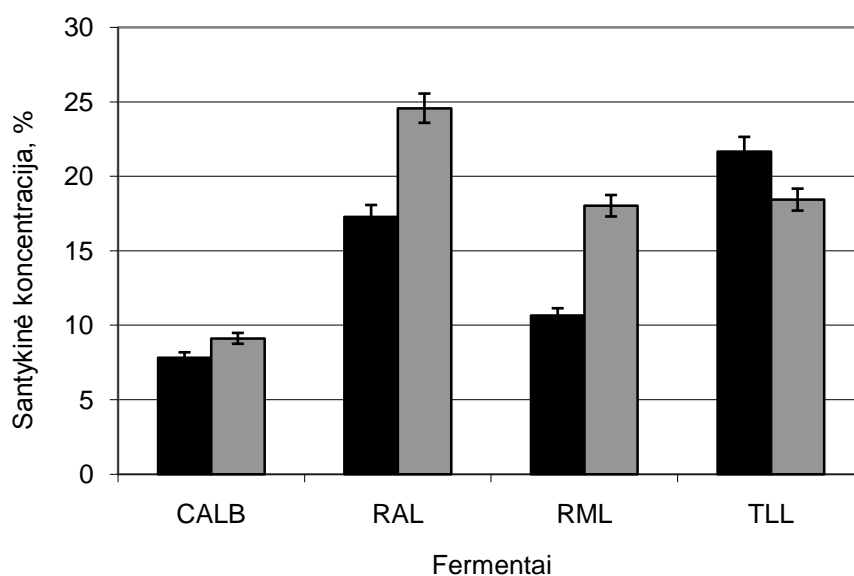


3.47 TLL su silikagelio priedu katalizuojamos trioleino etanolizės reakcijos substratų ir produktų sudėtis priklausomai nuo reakcijos trukmės. ■ – trioleinas, ▲ – dioleinas, □ – monooleinas, ◆ – etiloleatas, ○ – oleino rūgštis.



3.48 RAL katalizuojamos trioleino etanolizės reakcijos substratų ir produktų sudėtis priklausomai nuo reakcijos trukmės. ■ – trioleinas, ▲ – dioleinas, □ – monooleinas, ◆ – etiloleatas, ○ – oleino rūgštis.

Kaip ir galima būtų tikėtis iš paeiliui vykstančių reakcijų, monooleino ir dioleino koncentracijų kreivės turėjo maksimumus. Maksimalūs monooleino ir dioleino kiekiai suteikia įdomios informacijos apie santykinus įvairių acilglicerolių substratų konversijos greičius, naudojant skirtingas lipazes. Šios vertės yra didesnės monooleino nei dioleino atveju, kuomet naudojami fermentai CALB, RAL, RML (3.49 pav.), tai rodo, kad trečiasis alkoholizės reakcijos etapas šiais atvejais yra lėčiausias.



3.49 pav. Trioleino etanolizės metu susidarantys maksimalūs monooleino (■) ir dioleino (■) kiekiai

Tik TLL atveju maksimali dioleino koncentracija yra didesnė už monooleino. Mažiausios maksimalios abiejų dalinių acilglicerolių vertės stebimos naudojant CALB, todėl akivaizdu, kad šis fermentas labai efektyviai katalizuoja MO ir DO alkoholizę.

Norint gauti daugiau tiesioginės informacijos apie monoacilglicerolių konversiją, buvo susintetinti 2-MO ir 1-MO ir ištirta jų alkoholizės reakcija. Dauguma lipazių teikia pirmenybę triacilglicerolių 1 ir 3 pozicijoms, todėl vykstant triacilglicerolio alkoholizei gaunamas 2-MO - pagrindinis tarpinis junginys, kuris gali kauptis. Santykis tarp 2-MO alkoholizės greičio ir trioleino alkoholizės greičio suteikia informacijos, ar 2-MO sudaro butelio kaklelio efektą acilglicerolių konversijai į etilo esterius. CALB, priešingai nei kitos trys tirtos lipazės, konvertavo 2-MO labai greitai (3.15 lentelė), o RAL konvertavo lėtai. Šie rezultatai sutampa su pastebėjimu, kad maksimali susikaupusio 2-MO koncentracija naudojant CALB buvo daug mažesnė, nei naudojant kitas tris lipazes (3.49 pav.).

3.15 lentelė. Pradiniai reakcijos greičiai naudojant skirtingus substratus. Substratų koncentracijos buvo 150 mM (trioleino) ir 50 mM (1-, 2-monooleino).

Lipazė	Pradinis alkoholizės reakcijos greitis ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )			Greičių santykis
	Substratai			
	Trioleinas	1-monooleinas	2-monooleinas	2-monooleinas/1-monooleinas
<i>C. antarctica</i> B	0,29	1,00	1,05	1,05
<i>R. arrhizus</i>	3,75	0,89	0,11	0,12
<i>R. miehei</i>	45,69	57,50	17,64	0,31
<i>T. lanuginosus</i>	1,49	0,58	0,47	0,81

Naudojant tris iš keturių lipazių, 1-MO konversija buvo greitesnė nei 2-MO konversija, tačiau tarp fermentų stebima didelė variacija (3.15 lentelė). Tik RA konvertavo 1-MO daug greičiau (apie 8 kartus) nei 2-MO. RML konvertavo 1-MO apie tris kartus greičiau, nei 2-MO, tuo tarpu CALB ir TLL abiejų izomerų konversijos greičiai buvo panašūs. RAL, RML ir TLL yra laikomos 1,3-specifinėmis lipazėmis, tai sutampa su šio darbo metu gautais

duomenimis, nes alkoholizės reakcijos pradinėje stadijoje 1,2(2,3)-DO yra DO izomeras (> 95 % reakcijos pradžioje) (dominuojantis 3.38 pav.), o 2-MO – dominuojantis MO izomeras (3.37- 3.40 pav.). 3.15 lentelėje pateikti RML ir TLL rezultatai rodo, kad šių fermentų regioselektyvumas monoacilglicerolių atžvilgiu yra mažiau išreikštas nei triacilglicerolių atžvilgiu. Pastarieji yra įprastiniai lipazių substratai, kuriuos naudojant nustatomas regio-specifiškumas. Be to, galime padaryti išvadą, kad priedų naudojimas, norint katalizuoti acilgrupės migraciją ir pagerinti biodyzelino sintezės išeią gali duoti rezultatų tik tam tikrais atvejais.

### 3.4.7 Fermentų naudojimas etapais

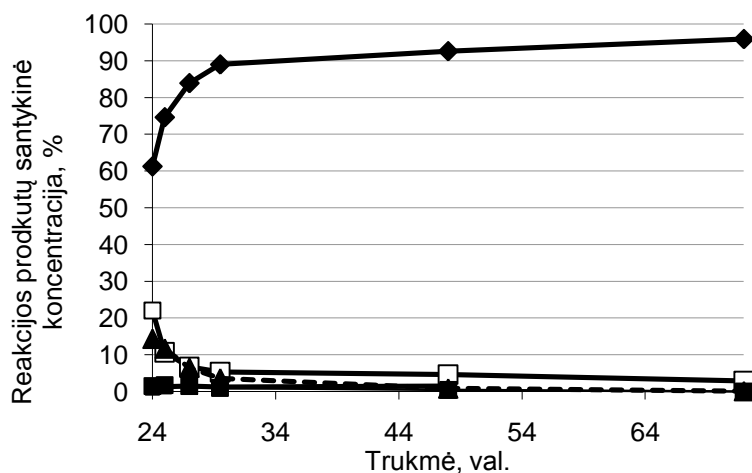
Turint omenyje lipazių skirtingą specifiškumą skirtingiems acilgliceroliams, nutarta, kad gali būti naudingas lipazių kombinacijų panaudojimas biodyzelino sintezės procese. Lipozyme TL IM ir Novozyme 435 (imobilizuota CALB) kombinacija buvo naudinga biodyzelino sintezei iš rapsų aliejaus *t*-butanolyje [254]. Parodyta kad abiejų fermentų naudojimas maždaug vienodais kiekiais yra optimalus biodyzelino sintezei iš taukų [255]. Aprašyta dviejų etapų reakcija, naudojant skirtingas lipazes skirtinguose etapuose: TLL naudota katalizuoti alkoholizės reakcijai, o antrame etape Novozyme 435 naudota pirmame etape susidariusių laisvų riebalų rūgščių esterinimui [256]. Tyrimų metu gauti rezultatai rodo, kad tirtų fermentų tarpe CALB yra geriausias fermentas DO ir MO konversijai, o likę trys lipazės efektyvesnės trioleino konversijos atžvilgiu. Todėl nuspręsta biodyzelino sintezės reakcijai panaudoti fermentų kombinacijas: vieno iš trijų fermentų pirmame reakcijos etape (RAL, RML, TLL) ir CALB antrame etape. Didžiausia etiloleato išeią buvo gauta naudojant RAL ir CALB (3.16 lentelė). Kaip žinia, RAL yra ryškiausiai 1,3-specifinė lipazė ir labai efektyviai skaldo trioleiną. Labai svarbu, kad pirmajame etape naudojamas fermentas sumažintų trioleino koncentraciją iki minimumo, nes CALB likusios trioleino koncentracijos beveik nebepakeičia. CALB buvo labai efektyvi DO konversijos atžvilgiu, nes DO koncentracija po šio etapo tapo ypatingai maža,

o pagrindinis likęs šalutinis produktas buvo MO. TLL su silikagelio priedu naudojimas pirmame etape leido šiek tiek padidinti biodyzelino išeią, tačiau vis tiek geriausiai veikianti kombinacija buvo RAL ir CALB.

3.16 lentelė. Trioleino etanolizės produktų sudėtis naudojant du fermentus paeiliui. I etapas: 24 valandos su RAL, RML arba TLL (ar TLL su silikagelio priedu), II etapas: 48 valandos su CALB, dedamos papildomos dvi etanolio porcijos. Reakcijos temperatūra 30 °C, išskyrus paskutinį atvejį, kai temperatūra buvo 40 °C.

Produktų santykinė koncentracija po 72 reakcijos valandų ( %)									
	Etiloleatas	Oleino rūgštis	2-MO	1-MO	1,2-DO	1,3-DO	TO	Bendra MO	Bendra DO
RAL+CALB	94,9	1,2	0,3	3,0	0,2	0,2	0,2	3,3	0,4
RML+CALB	91,6	1,1	0,4	3,0	0,4	1,0	2,5	3,4	1,4
TLL+CALB	91,7	1,1	0,4	2,9	0,4	0,7	2,9	3,3	1,1
TLL+SI+CALB	93,1	2,2	0,4	2,7	0,4	0,3	0,9	3,1	0,7
RAL+CALB 40°C	95,9	1,1	0,3	2,6	0,1	0,1	0,0	2,9	0,1

Padidinus reakcijos temperatūrą nuo 30°C iki 40 °C, reakcijos išeią pavyko padidinti nuo 94,9 % iki 95,9 %. Antro reakcijos etapo metu susidariusių produktų koncentracijų pokyčiai pavaizduoti 3.50 paveiksle. Matome, kad visų acilglicerolių koncentracija nuosekliai mažėja ir tampa labai maža, didžiausia yra šalutinio produkto MO koncentracija, kurios apatinė riba šiuo atveju yra 2,6 %. Reakcijos pabaigoje jau yra nusistovėjusi pusiausvyra tarp MO izomerų: 2-MO jame sudaro apie dešimtadalį.



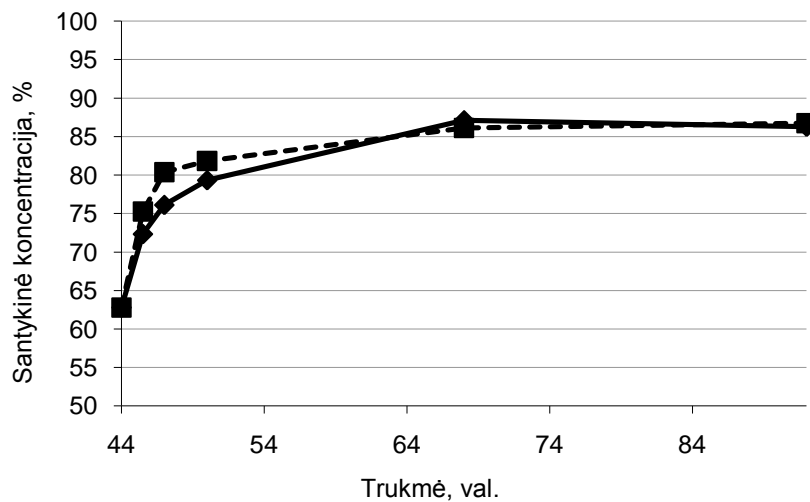
3.50 Dviem etapais katalizuojamos trioleino etanolizės reakcijoje dalyvaujančių junginių sudėtis antro etapo metu. Pirmą etapą katalizavo RAL, antrą CALB, 40 °C, dedamos dvi papildomos etanolio porcijos. ■ – trioleinas, ▲ – dioleinas, □ – monooleinas, ◆ – etiloleatas, ○ – oleino rūgštis.

### **3.4.7.1 Reakcija be tirpiklio**

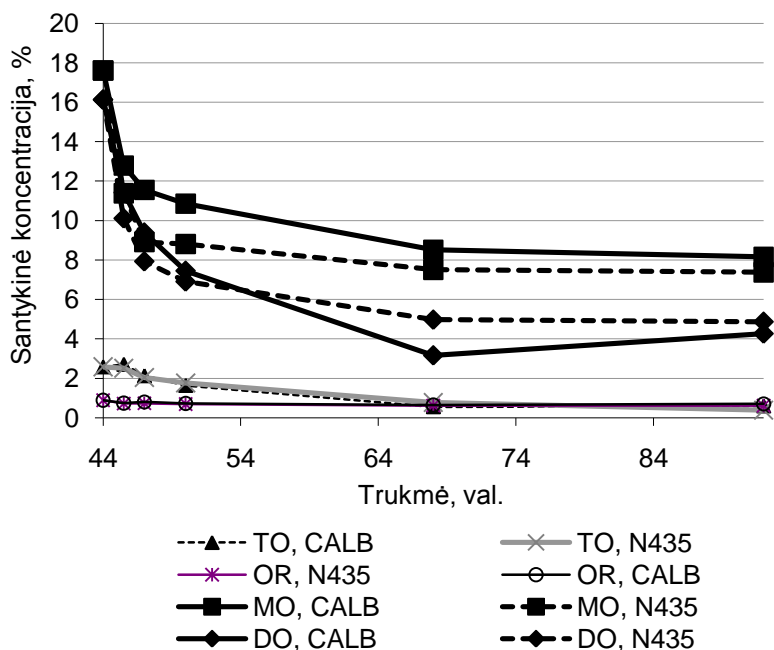
Žvelgiant iš ekonominės perspektyvos, biodyzelino fermentinė sintezė reakcijos sistemoje nenaudojant tirpiklio yra visokeriopai pranašesnė už tirpiklyje vykdomą sintezę. Todėl buvo pabandyta tyrimų metu gautas žinias apie fermentų savybes ir tarpinių trioleino etanolizės reakcijos junginių virsmus pritaikyti reakcijos sistemai be tirpiklio.

Taikytas dviejų pakopų reakcijos planas, vykdant pirmąjį reakcijos etapą norėta palyginti RAL, TLL ir komercinį TLL preparatą Lipozyme TL-IM, antrajame etape naudoti CALB, tačiau iškilo nenumatyta problema – ant Acurell MP1000 imobilizuotos RAL ir TLL buvo inaktyvuotos pirmajame reakcijos etape ir aktyvumu pasižymėjo tik komercinis preparatas, kuriame TLL imobilizuota ant silikagelio adsorbcijos ir tuo pačiu įterpimo į kapsulę būdu [36, 37]. Manome, kad fermentai buvo inaktyvuoti etanolio, kurio tik dalis ištirpsta trioleine, o likusi dalis sudaro atskirą fazę. Etanolis gerai drėkina Acurell MP1000 polipropileno nešiklį, todėl tikėtina, kad lokali etanolio koncentracija nešiklio paviršiuje tapo pakankamai didelė, kad inaktyvuotų fermentus. Parodyta, kad sistemoje be tirpiklio etanolis dalinai inaktyvuoja ant silikagelio imobilizuotą preparatą, todėl norint pasiekti geresnę reakcijos išėigą rekomentuojama etanolį į pradinį reakcijos mišinį įvesti dalimis [252]. Tačiau pirmojo etapo metu, net ir dedant visą etanolį iš karto, per 44 valandas pavyko pasiekti 63 % etiloleato koncentraciją ir 2,6 % likusio trioleino koncentraciją. Antras etapas vyko labai panašiai, nepriklausomai nuo to, ar buvo naudojamas komercinis, ar laboratorijoje imobilizuotas preparatas, ir reakcijos išėiga po 70 valandų siekė 86 % (3.51, 3.52 pav.). Reakcijose be tirpiklio reakcijos išėiga dažniausiai yra mažesnė, ji vyksta lėčiau, nei reakcijos kuriose naudojamas tirpiklis. Atsižvelgiant į tai, kad buvo naudota nedidelė fermentų preparatų koncentracija (4 % skaičiuojant pagal tirpalo tūrį), o literatūroje dažnai pateikiami tyrimų pavyzdžiai, kuriuose naudojama 15-25 % fermento koncentracija [252, 257], galime teigti, kad konversijos laipsnis yra palyginus geras, o ilga reakcijos trukmė pateisinama.





3.51 Etiloleato koncentracija antrame trioleino etanolizės reakcijos etape, be tirpiklio, reakciją katalizuojant CALB, imobilizuotai ant MP1000 (◆) ir komerciniam Novozymes 435 (■) preparatui. Pirmame etape naudojamas Lipozyme TL-IM.



3.52 Trioleino ir šalutinių reakcijos produktų koncentracija antrame trioleino etanolizės reakcijos etape, be tirpiklio, reakciją katalizuojant CALB, imobilizuotai ant Acurell MP1000 ir komerciniam Novozymes 435 preparatui. Pirmame etape naudojamas Lipozyme TL-IM.

Nuspręsta išmėginti didesnio masto biodyzelino sintezę naudojant natūralią augalinę žaliavą - rapsų aliejų ir fermentus: Lipozyme TL-IM pirmame etape, o CALB ant Acurell MP 1000 antrame etape. Iš reakcijos produktų buvo pašalintas glicerolis (plaunant vandeniu). Šios sintezės reakcijos

metu gauta 84,2 % esterių išeiga (3.17 lentelė). Nors ir nepavyko pasiekti ypatingai mažų parcialinių acilglicerolių koncentracijų, kurios buvo pasiektos MTBE sistemoje, konversija, lyginant su kitų autorių fermentinės biodyzelino sintezės be tirpiklio duomenimis yra gera [163]. Dažnai didesnės nei 90 % išeigos nenanudojant tirpiklio yra gaunamos leidžiant reakcijos mišinį per fermentu užpildytas kolonėles, vykdant reakciją pakopomis ir papildomai dedant alkoholio bei iš reakcijos mišinio šalinant glicerolį [258], arba naudojant neįtikėtinais dideliais fermento kiekiais (50 % m/m) [253]. Taigi, darbo metu pasiūlyta dviejų pakopų reakcijos schema yra perspektyvi, todėl ją panaudojus fermentų kolonėlių sistemoje, dedant alkoholį dalimis bei papildomai šalinant iš reakcijos mišinio glicerolį galima tikėtis ypač gerų rezultatų.

3.17 lentelė. Rapsų aliejaus peresterinimas etanoliu be tirpiklio, reakciją vykdant dviem etapais (I – Lipozyme TL-IM fermentas, II- CALB).

Produktai	Kiekis (masės %)
RR esteriai	84,2
Monoacilgliceroliai	3,84
Diacilgliceroliai	3,34
Triacilgliceroliai	1,98
Glicerolis	0

Skyriaus išvados:

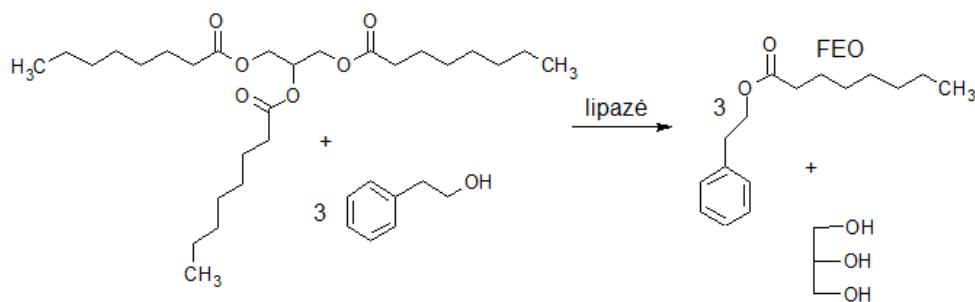
1. Reakcijos priedų įtaka skirtingų fermentų katalizuojamoms trioleino etanolizės (biodyzelino sintezės) reakcijoms yra nevienareikšmiška. Vanduo ir silikagelis labiausiai padidino etiloleato išeigą, tačiau vanduo lėmė nepageidautiną trioleino hidrolizę (šalutinio produkto – oleino rūgšties – susidarymą).
2. Reakciją katalizuojant RML, TLL ir RAL silikagelio priedas skatino TO etanolizės metu vykstančią 2-MO izomerizaciją. Priešingai, reakciją katalizuojant CALB, silikagelio priedas 2-MO izomerizaciją slopino. Vanduo, RML ir TLL atvejais turintis teigiamos įtakos 2-MO izomerizacijai, RAL ir CALB atvejais izomerizaciją slopino, be to pastaruoju atveju smarkiai slopino ir paties fermento aktyvumą.

3. Pradiniai etanolizės reakcijos greičiai skirtingų acilglicerolių atžvilgiu buvo skirtingi. CALB santykinai lėtai vykdė trioleino etanolizę, bet pasižymėjo labai dideliu aktyvumu monoacilglicerolių atžvilgiu ir neteikė pirmenybės nė vienam iš MO izomerų. Priešingai, RAL labai greitai vykdė TO etanolizę, o 1-MO skaldė 8 kartus greičiau, nei 2-MO. RML 1-MO skaldė panašiu greičiu, kaip ir TO, ir apie 3 kartus greičiau, nei 2-MO, TO etanolizė, katalizuojama TLL, vyko apie 3 kartus greičiau, nei MO etanolizė, o abiejų MO izomerų etanolizė vyko panašiais greičiais. Todėl nuspręsta reakciją vykdyti etapais – pirmąjį katalizuojant fermentu, gebančiu santykinai greičiausiai skaldyti TO (RAL), antrąjį – fermentu, gebančiu greičiausiai vykdyti susidarančių tarpinių junginių – MO izomerų etanolizę (CALB).
4. Vykiant reakciją etapais (I RAL, II – CALB), kiekviename iš jų naudojant 2 % (m/v) imobilizuoto fermento preparato, esant 40 °C per 72 val. pasiekta 96 % etiloleato santykinė koncentracija. Pagrindinis šalutinis produktas – monooleinas (1-MO 2,6 %, 2-MO 0.3 %). Vykiant reakciją be tirpiklio, naudojant po 4 % (m/v) fermento ir I etape naudojant Lipozyme TL IM, po 70 valandų gauta 86 % etiloleato. Taigi, dviejų etapų sistema, kiekvienam etapui parenkant fermentą, pagal reakcijoje esantį pagrindinį substratą, pasiteisino, buvo gauta gera produkto išeiga naudojant palyginus mažą katalizatoriaus kiekį.

### ***3.5 Feniloktanoato ir kitų feniloktanoato esterių fermentinė sintezė***

#### **3.5.1 Fermentų atranka feniloktanoato sintezei**

Feniloktanoatas (FEO) – oktano (kaprilinės) rūgšties ir 2-feniletilo alkoholio esteris - natūralus aromatinis junginys, randamas romo, spirituotuose gėrimuose ir vyne. Šis junginys, kaip ir kiti riebalų rūgščių esteriai, gali būti sintetinamas fermentiniu būdu esterinimo ar peresterinimo keliu, naudojant lipazę (3.53 pav.), tokiu būdu gaunant junginį, kuris galėtų būti klasifikuojamas kaip „natūralus“ (priešingai, nei susintetintas cheminiu būdu).



### 3.53 pav. Feniloktanoato sintezė peresterinimo būdu

Galimybė gauti didelę sintezės išeigą priklauso ne tik nuo gerai parinktų reakcijos sąlygų, bet ir nuo sėkmingai pasirinkto katalizatoriaus (fermento). Visos lipazės natūraliai katalizuoja triacilglicerolių esterinės jungties hidrolizę, tačiau specifiškumas ir selektyvumas skirtingiems substratams skiriasi [80]. Dažniausiai skirtingo selektyvumo priežastis yra fermento aktyvaus centro struktūra, tačiau net ir ją žinant sunku prognozuoti fermento galimybes katalizuoti vieną ar kitą reakciją, ypač kai naudojami nenatūralūs lipazių substratai [1].

FEO sintezė skiriasi nuo įprastai lipazėmis katalizuojamų reakcijų tuo, kad šioje reakcijoje acilakceptorius yra aromatinis alkoholis 2-feniletanolis (2-FE), kuris dėl savo aromatinio žiedo struktūros gali skirtingai nuo alifatinių alkoholių sąveikauti su lipazių aktyviu centru. Dėl šios priežasties ne visos lipazės gali būti aktyvios naudojant 2-FE, nors jos ir pasižymi dideliu esterinimo ar peresterinimo aktyvumu naudojant alifatinius alkoholius [259].

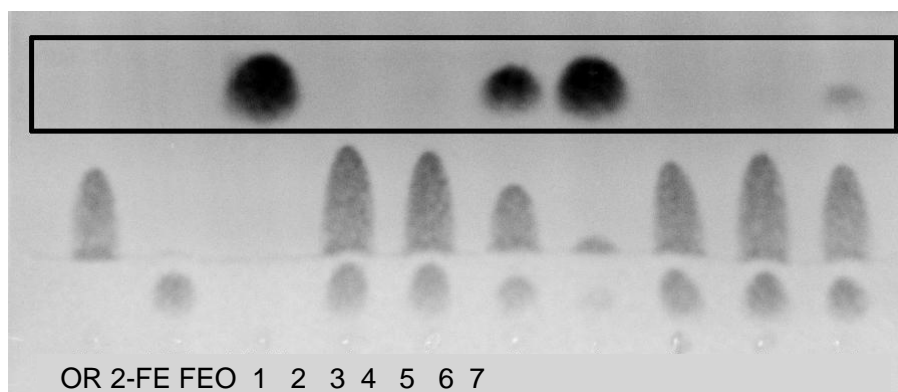
Literatūroje aprašyta, kad grybinės lipazės iš *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa* ir *Aspergillus niger* geba katalizuoti FEO sintezę iš kokosų pieno, kurio trigliceridų sudėtyje yra oktano (kaprilo) rūgšties (OR), ir 2-FE, tačiau neaprašytas nei reakcijos konversijos laipsnis, nei optimalios sintezės sąlygos [202].

Mėginta ne tik surasti tinkamiausią fermentinį preparatą FEO sintezei, bet ir optimizuoti reakcijos sąlygas.

Fermentų atrankai buvo pasirinkta kaprilo rūgšties esterinimo feniletanolio reakcija bei šios komercinės lipazės: Palatase® 20000 L, Lipozyme® RM IM, Lipoclean®, Lipopan® F BG, Lipolase L EX bei nekomercinės lipazės iš *Enterobacter aerogenes* ir *Pseudomonas mendocina*.

Lipozyme RM IM ir Palatase yra tos pačios lipazės iš *Rhizomucor miehei* preparatas, pirmasis yra imobilizuotas, o antrasis - skystas [29]. Šie preparatai buvo pasirinkti, norint palyginti tirpaus ir imobilizuoto preparato veiksmingumą katalizuojant tą pačią reakciją. Kiti du Novozymes® preparatai buvo pasirinkti tikintis, kad pasireikš platus jų substratinis specifiškumas, kuriuo jie turėtų pasižymėti pagal savo taikymo pobūdį: Lipoclean naudojamas skalbiklių sudėtyje, Lipopan – kepimo pramonėje [29]. Lipolase L (EX) buvo pasirinkta dėl savo didelio aktyvumo peresterinimo reakcijose (3.3 skyrius bei mūšų grupės nepublikuoti duomenys). *Enterobacter aerogenes* lipazė buvo pasirinkta dėl savo specifiškumo hidrolizuoti vidutinio ilgio RR esterius, ypač kaprilo rūgšties *p*-nitrofenilo esterį [260]. *Pseudomonas mendocina* lipazė - dėl savo santykinai didesnio aktyvumo natūraliam substratui kokosų aliejui, nei ilgesnes RR turinčiam TO ar alyvuogių aliejui [76].

Fermentų atrankos rezultatai pavaizduoti 3.54 pav. FEO susidarymas akivaizdus po dviejų reakcijos valandų, kuomet reakcija katalizuojama Palatase® (3 takelis) ir Lipozyme® RM IM (4 takelis). Žymiai mažesnis produkto kiekis aptinkamas Lipolase L (EX) atveju (7 takelis). Esterinimo aktyvumo nebuvo pastebėta Lipopan F BG bei *E. aerogenes* ir *Ps. mendocina* lipazių atveju. Atrankos reakcijos išėigos po 2 ir 24 valandų pavaizduotos 3.18 lentelėje.



3.54 pav. Lipazių atranka 2-FEO sintezei: kaprilo rūgšties esterinimas 2-FE. Reakcijos trukmė 2 val., temperatūra 30 °C. Takeliai: OR, FE, FEO - standartai, reakcija, katalizuojama Lipopan® F BG (1), Lipoclean® (2), Palatase® (3), Lipozyme® RM IM (4), *Ps. mendocina* lipazės (5), *E. aerogenes* lipazės(6), Lipolase® 100 L EX (7). Reakcijos produktas (esteris) apibrėžtas.

3.18 lentelė. Lipazių atrankos FEO sintezei rezultatai. Duomenys pateikti tik aktyvioms lipazėms.

Fermentas	Atrankos reakcijų esterinimo išeiga*, %	
	2 val.	24 val.
Palatase®	33,5	67,3
Lipozyme® RM IM	63,8	70,8
Lipolase® 100 L EX	4,1	62,9

\* standartinis nuokrypis = 1.51

FEO susidarymas patvirtintas dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

Jau po dviejų reakcijos valandų naudojant tiek tirpią, tiek imobilizuotą RML buvo gaunamos didelės išeigos, todėl šie du preparatai buvo pasirinkti tolesniems tyrimams ir optimalių reakcijos sąlygų nustatymui.

FEO sintezės tyrimams pasirinkome tris skirtingus substratus: OR, gliceril trikaprilatą (TK) ir kokosų aliejų (KA). TK – trigliceridas, natūralių substratų modelis, kurio sudėtyje yra tik viena riebalų rūgštis – OR. Kokosų aliejus yra natūralus substratas, turintis OR, kuris galėtų būti naudojamas natūralių aromatinių esterų sintezei. OR taip pat yra pieno riebalų sudėtyje, pvz. svieste [202]. Abiejų substratų (TK ir KA) atveju vyksta peresterinimo reakcija, OR esterinimo reakcija pasirinkta norint ją palyginti su peresterinimo reakcija.

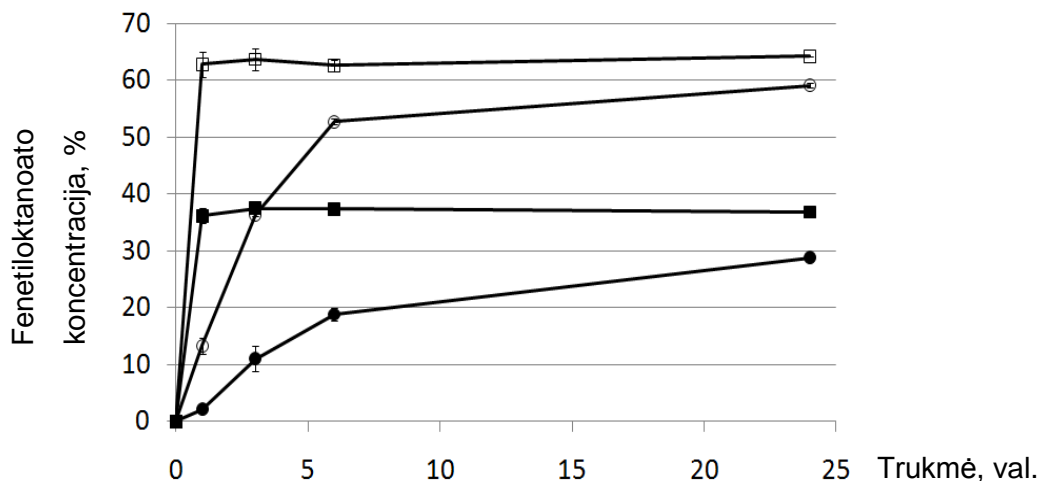
### 3.5.2 Tirpiklio įtaka

Tiek FEO sintezės reakcijos substratai, tiek produktas yra menkai tirpūs vandenyje. Be to, vanduo gali lemti reakcijos produkto hidrolizę, todėl galima mažesnė išeiga. Reakcijos terpės atrankai buvo pasirinkti du įprastiniai organiniai tirpikliai. Lipazių aktyvumas ir specifiškumas dažnai priklauso nuo tirpiklių fizikocheminių savybių, ypač hidrofobiškumo [100, 108], todėl buvo išbandyti du skirtingo poliškumo tirpikliai: n-heksanas (nepolinis) ir *tret*-butanolis (polinis), kurių 1-oktanolio/vandens pasiskirstymo koeficientų -  $\log P$  - vertės atitinkamai lygios 4,00 ir 0,35 [261]. Yra žinoma, kad esterinant undekano (C11) rūgštį gliceroliu, katalizuojant RML (Lipozyme® IM20), didžiausios išeigos gaunamos naudojant didžiausias  $\log P$  vertes (4.0-4.5) turinčius tirpiklius [104].

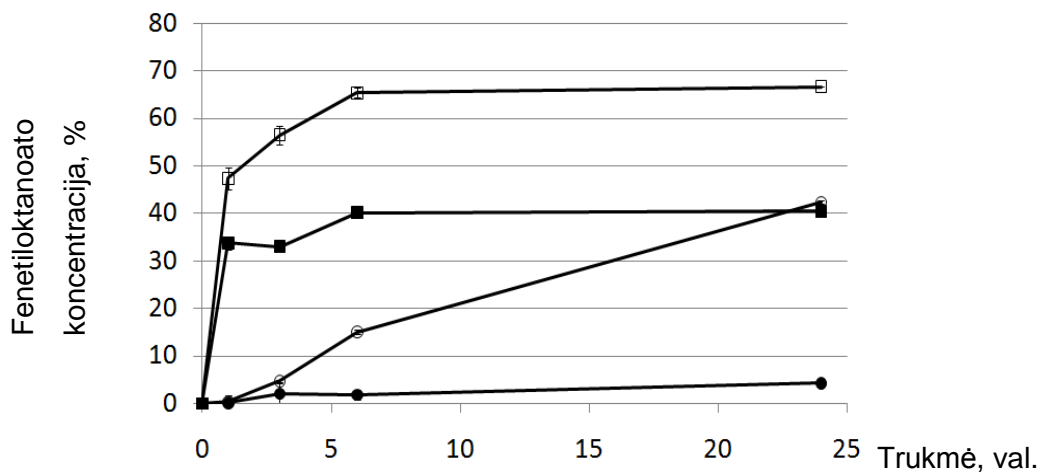
Palyginę abiejų fermentų preparatų aktyvumą heksane ir *tret*-butanolyje, matome, kad abu preparatai yra aktyvesni heksane (3.55 pav.). Nors didesnė santykinė esterių koncentracija po 6 val. (63 %) gaunama heksane, pradiniai reakcijos greičiai priklauso nuo naudojamo preparato tipo ir yra didesni imobilizuoto fermento atveju. Naudojant imobilizuotą fermentą reakcija pasiekia plato fazę po 1 valandos, tuo tarpu naudojant tirpų fermentą (Palatase), produkto koncentracija vis dar didėja po 6 reakcijos valandų tiek heksane, tiek *tret*-butanolyje. Iš dalies tai galima paaiškinti mažesniu tirpaus fermento aktyvumu (lyginant *p*-NPB hidrolizės aktyvumus 2.1 lentelė), nors, kaip jau buvo pastebėta ankstesniuose skyriuose, lipazių aktyvumai hidrolizės ir sintezės reakcijose dažniausiai nekoreliuoja.

Ta pati tendencija stebima vykdant peresterinimo reakciją, naudojant substratą TK (3.56 pav.): *tret*-butanolyje po šešių reakcijos valandų stebima žymiai mažesnė FEO santykinė koncentracija nei naudojant tuos pačius fermentus heksane. Peresterinimas yra ypatingai lėtas, naudojant tirpų fermentą Palatase *tret*-butanolyje ir po paros siekia tik 4,3 %.

Didžiausia santykinė koncentracija pasiekama naudojant imobilizuotą fermentą (Lipozyme® RM IM) heksane, po šešių reakcijos valandų pasiekiami apie 65 % ir daugiau nedidėja. Naudojant imobilizuotą fermentą pusiausvyra taip pat pasiekiami po šešių valandų, tačiau išeiga tesiekia 40 %.



3.55 pav. FEO sintezės oktano (kaprilo) rūgštį esterinant 2-FE priklausomybė nuo reakcijos trukmės, naudojant skirtingas fermento formas ir tirpiklius: ■ – Lipozyme RM IM *tert*-butanolyje, □ – Lipozyme RM IM heksane, ● – Palatase *tert*-butanolyje, ○ – Palatase heksane, fermentų koncentracija 4,2 %.

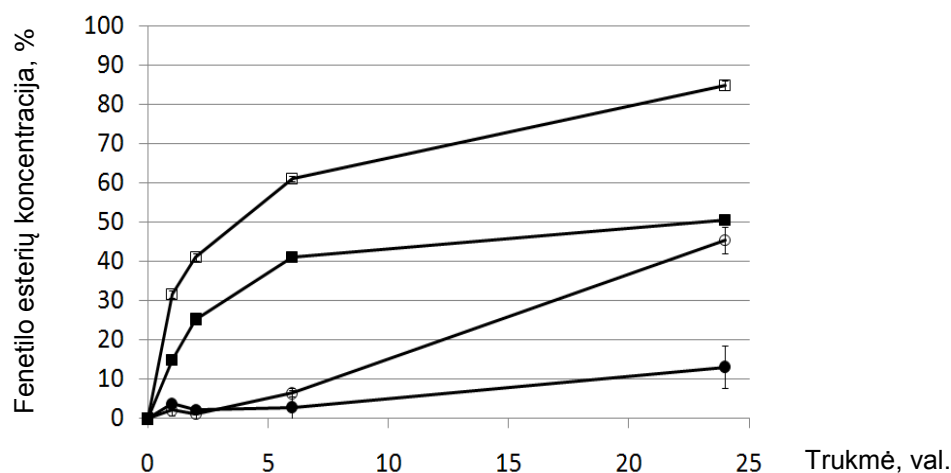


3.56 pav. FEO sintezės TK peresterinant 2-FE priklausomybė nuo reakcijos trukmės, naudojant skirtingas fermento formas ir tirpiklius: ■ – Lipozyme RM IM *tert*-butanolyje, □ – Lipozyme RM IM heksane, ● – Palatase *tert*-butanolyje, ○ – Palatase heksane, fermentų koncentracija 4,2 %.

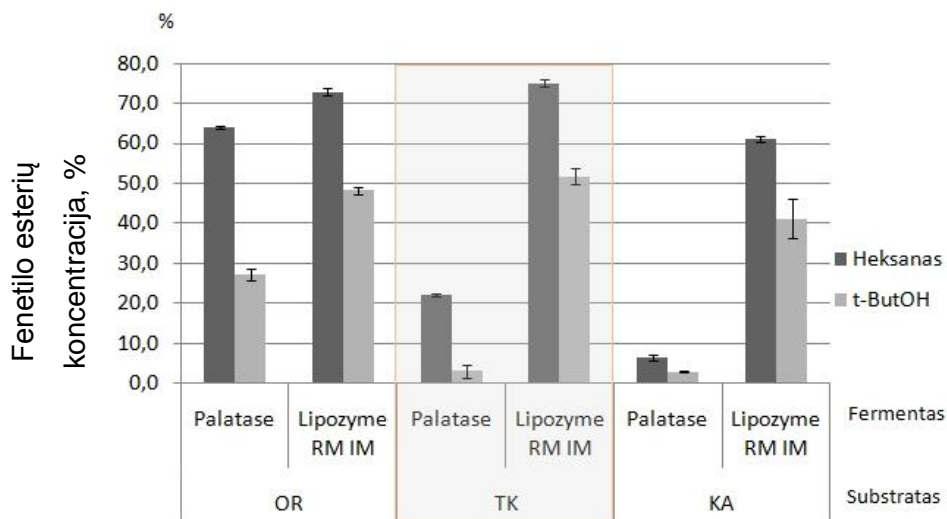
Kokosų aliejaus peresterinimo reakcijai naudojant augalinės kilmės substratą vėlgi stebima ta pati tendencija: naudojant imobilizuotą preparatą Lipozyme RM IM reakcija vyksta greičiau, nei naudojant skystą ir išeiga



didesnė heksane. Pagrindinis skirtumas nuo prieš tai aprašytų reakcijų yra tas, kad produkto koncentracija bet kuri fermentą ir tirpiklį didėja net ir po šešių reakcijos valandų ir pasiekia virš 80 % naudojant Lipozyme RM IM heksane (3.57 pav.). Reakcijos profilis galėjo pakisti dėl kompleksinės riebalų rūgščių sudėties kokosų aliejuje, kuomet vienos riebalų rūgštys fermento atskeliamos greičiau, kitos lėčiau, nei oktano rūgštis. Dėl lėčiau skeliamų riebalų rūgščių reakcija užsitęsia ir pusiausvyra per šešias valandas nespėja nusistovėti. Kita vertus, kokosų aliejus ir reakcijos produktai galėjo turėti teigiamos įtakos fermento stabilumui, nes naudojant kompleksinį substratą susidaro įvairaus grandinės ilgio RR fenetilo esteriai bei mono- ir digliceridai, kurie galimai keičia tirpalo savybes. Skirtingų substratų poliškumas gali skirtingai veikti vandens mikrokiekių pasiskirstymą tarp kietos fazės (imobilizuoto fermento preparato) ir skystos fazės (substratų, tirpiklio ir produktų), tai gali drastiškai pakeisti fermento aktyvumą [262].



3.57 pav. FEO sintezės kokosų aliejų peresterinant 2-FE priklausomybė nuo reakcijos trukmės, naudojant skirtingas fermento formas ir tirpiklius: ■ – Lipozyme RM IM *tert*-butanolyje, □ – Lipozyme RM IM heksane, ● – Palatase *tert*-butanolyje, ○ – Palatase heksane, fermentų koncentracija 4,2 %.



3.58 pav. FEO sintezės (konversijos laipsnio) palyginimas, naudojant skirtingus substratus (OR – oktano rūgštis, TK – trikaprilinas, KA – kokosų aliejus), skirtingus tirpiklius: ■ – heksanas, ■ – *tert*-butanolis ir skirtingas fermento formas (tirpi – Palatase, imobilizuota Lipozyme RM IM), reakcijos trukmė - 6 val, fermentų koncentracija 4,2 %.

Visų trijų substratų (OR, TK ir kokosų aliejaus) atveju reakcija su 2-FE greičiau ir didesniu konversijos laipsniu vyksta heksane naudojant Lipozyme RM IM lipazę, be to, imobilizuoto fermento naudojimas turi didelį pranašumą dėl lengvo katalizatoriaus atskyrimo nuo reakcijos mišinio ir pakartotinio panaudojimo galimybes, todėl šis fermentinis preparatas ir tirpiklis heksanas buvo pasirinkti tolesniems tyrimams – optimalių reakcijos sąlygų nustatymui.

### 3.5.3 Modelio sudarymas ir optimalių reakcijos sąlygų nustatymas naudojant atsako paviršiaus metodologiją

Paprastų vaisinių kvapiųjų esterių fermentinės sintezės sąlygos dažnai optimizuojamos naudojant APM [182, 263–266]. Dažniausiai jie esteriai sintetinami tiesioginio esterinimo būdu, tačiau yra ir peresterinimo reakcijų pavyzdžių: rožių kvapo aromatinis esteris 2-fenilacetatas sintetinamas peresterinant vinilacetatą 2-FE, optimizuota APM, esterių išeiga per 79 min. pasiekia 85,4 %, naudojant *Candida antarctica* fermentą Novozyme® 435, esant 50 mM substratų koncentracijoms heksane [267]. Šiuo ir kitais atvejais, kuomet sintetinami acetatai, peresterinimo (arba interesterinimo) reakcija yra labiau tinkama, nes tiesioginio esterinimo metu acildonoras yra laisva acto rūgštis, kuri dažniausiai turi neigiamos įtakos fermento stabilumui

(denatūracija). Pagrindinė priežastis, dėl kurios FEO (substratas TK) optimizavimo tyrimams buvo pasirinkta peresterinimo reakcija, buvo siekis sukurti modelinę sistemą „natūralių“ esterių sintezei, t.y. TK buvo kaip gamtoje aptinkamų riebalų, turinčių OR, modelis.

Optimizavimo metu buvo nustatoma fermento ir substratų koncentracijos, reakcijos temperatūros ir trukmės įtaka FEO išeigai.

Eksperimento planas ir atsakai stebimomis vertėmis pateikti 3.19 lentelėje. Pasirinktas kvadratinis modelis, pašalinant nereikšmingas dedamąsias. Modelis yra reikšmingas, p vertė ( $P > F$ )  $< 0.0001$ , koreguotas determinacijos koeficientas  $R^2 = 0.9167$ . ANOVA pateikta priedų

P.8 lentelėje ir P.9 lentelėje.

3.19 lentelė. Kintamųjų vertės pagal centrinį kompozicinį APM eksperimento planą, naudotą fenetiloktanoato sintezės reakcijos optimizavimui.

Mėginys s	Veiksny s A: Fermento koncentracija, %	Veiksny s B: Substratų koncentracija , mM	Veiksny s C, Temperatūra, ° C	Veiksny s D, trukmė, min	Atsakas, Fenetiloktanoat o konversija, %
1	7	0,8	40	60	64,9
2	7	0,8	40	120	72,6
3	4,5	1,4	35	90	59,1
4	9,5	1,4	35	90	65,3
5	4,5	1,4	35	90	55,4
6	0,10	1,4	35	90	21,5
7	2	2	40	120	42,4
8	2	2	30	60	36,2
9	4,5	2,6	35	90	49,6
10	7	2	30	120	53,8
11	4,5	1,4	25	90	49,3
12	2	0,8	30	120	62,4
13	4,5	1,4	35	30	50,0
14	4,5	1,4	35	90	57,4
15	4,5	1,4	35	90	53,1
16	2	2	40	60	32,0
17	7	0,8	30	60	77,1
18	4,5	0,20	35	90	79,3
19	4,5	1,4	35	90	56,8
20	2	0,8	30	60	52,1

21	7	2	40	60	48,1
22	7	0,8	30	120	82,2
23	2	0,8	40	60	47,7
24	7	2	30	60	52,8
25	2	2	30	120	44,3
26	4,5	1,4	45	90	56,0
27	2	0,8	40	120	52,5
28	7	2	40	120	54,3
29	4,5	1,4	35	90	55,6
30	4,5	1,4	35	150	65,5

Modelio lygtis stebimomis vertėmis pateikta 3.20 lentelėje.

3.20 lentelė. Modelinės lygties koeficientai stebimomis vertėmis

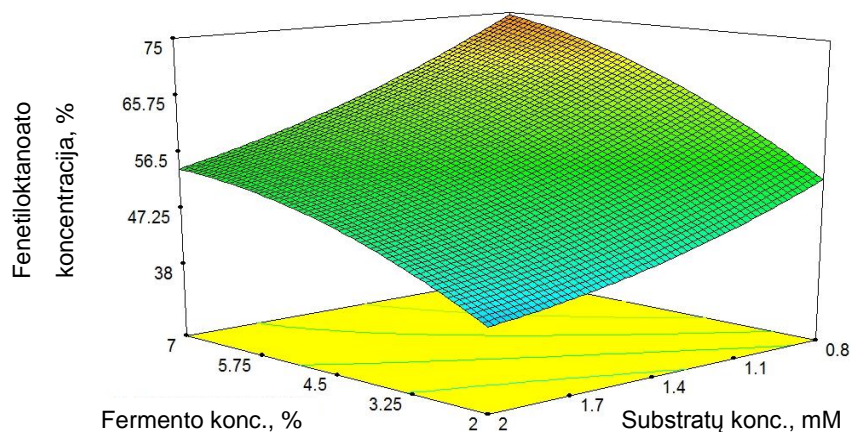
Veiksny	Modelio koeficientas
Laisvasis narys (intercept)	+76.85
Fermento koncentracija	+10.61
Substratų koncentracija	-45.14
Temperatūra	-1.01
Trukmė	+0.12
Fermento konc. · Substratų konc.	-1.16
Substratų konc. · Temperatūra	+0.53
Fermento konc. <sup>2</sup>	-0.57
Substratų konc. <sup>2</sup>	+6.24

Bendra reakcijos veiksnių įtaka geriau suprantama analizuojant atsako paviršiaus priklausomybes. Trijų matmenų grafiniame atvaizde galime stebėti dviejų kintamųjų įtaką, likusių vertės turi būti nekintančios (pasirinktos vidutinės vertės).

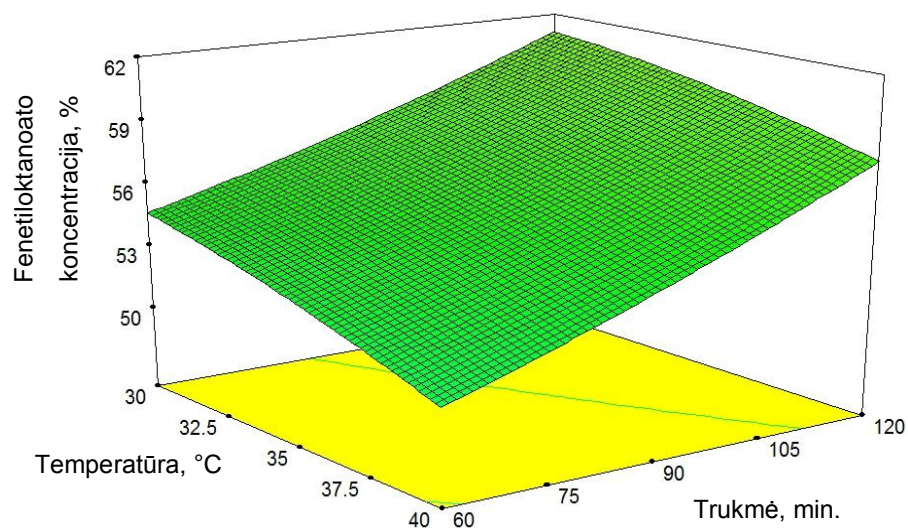
Esant 35 °C temperatūrai ir reakcijai trunkant 90 minučių, produkto santykinė koncentracija svyruoja nuo 37 %, kai fermento koncentracija 2 %, substratų koncentracija 2 M iki 75 %, kai fermento koncentracija 7 %, substratų koncentracija 0,8 M. Matome, kad fermento koncentracija turi teigiamos įtakos produkto išeigai, o substratų koncentracijos – neigiamos (3.59 pav.), t.y., kuo mažesnė substratų koncentracija, tuo didesnio peresterinimo laipsnio galima tikėtis. Šio poveikio priežastis gali būti fermento įsotinimas ar fermento inaktyvacija substratais. Padidinus fermento koncentraciją, galima kompensuoti didesnės substrato koncentracijos neigiamą įtaką.

Krishna ir bendradarbių duomenimis esterinio reakcijos substratų koncentracijos didinimas drastiškai sumažina konversiją sintetinant izoamilo acetatą: esant 0,06 M substratų koncentracijoms esterinio laipsnis viršija 95 %, esant 0,3 M substratų koncentracijoms – esterinio laipsnis tik 12 %. Sintetinant kitus izoamilo esterius (propionatą ir butiratą) stebimas panašus produktų koncentracijos mažėjimo pobūdis, tačiau reakcijos išeigos žymiai didesnės esant vidutinėms substrato koncentracijoms (0,25-0,5 M) [268]. Autoriai eksperimentiškai įrodė, kad reakcijos substratas - rūgštis (šiuo atveju – acto rūgštis) prisijungia prie imobilizuoto fermento, ištirpdama vandens mikrosluoksnyje, kuris supa imobilizuotą fermentą. Pagal Laane hipotezę poliniai substratai fermento vandeninėje mikroaplinkoje gali paskiekti tokias lokalias koncentracijas, kurios denatūruoja fermentą [269]. Šiame darbe atliktų tyrimų atveju tik esterinio reakcijos metu laisva oktano rūgštis turi galimybę disocijuoti vandens mikrosluoksnyje aplink fermentą, tačiau substratas TK šiuo mechanizmu fermento inaktyvinti negali. Tačiau tikėtina fermento inaktyvacija alkoholiu, nes Krishna aprašė silpną inaktyvaciją izoamilo alkoholiu jo koncentracijoms viršijus 1 M [191].

Esant vidutinėms substratų ir fermento koncentracijoms, reakcijos temperatūra, nepriklausomai nuo reakcijos trukmės, turi neigiamos įtakos, tai reiškia, kad katalizė geriau vyksta žemesnėje temperatūroje (30 °C) (3.60 pav.). Ta pati tendencija buvo stebima naudojant šį fermentą LSA ir KT peresterinio etanolio reakcijoms (3.3.2.2 skyrius, 127 psl.), tačiau neigiamos temperatūros įtakos nepastebėta naudojant tirpią šio fermento formą Palatase TO hidrolizės ir peresterinio metanolio reakcijoms (3.2.1.4 skyrius 112 psl. ir 3.2.2 skyrius 119 psl.). Toks tirpaus fermento stabilumas esant 60 °C ir žymus imobilizuoto aktyvumo mažėjimas didėjant temperatūrai 30–40 °C intervale, yra šiek tiek neįprastas, nes dažniausiai fermento imobilizacija turi teigiamos įtakos termostabilumui ir padidina temperatūrinį optimumą [234, 260], tačiau šiuo atveju tiesioginių išvadų negalime padaryti, nes skirtingos fermento formos naudotos skirtingoms reakcijoms katalizuoti skirtingose sąlygose.



3.59 pav. Atsako paviršiaus modelis: substratų ir fermento koncentracijų įtaka susidarancio feniloktanoato koncentracijai. Temperatūra 35 °C, reakcijos trukmė 90 min.

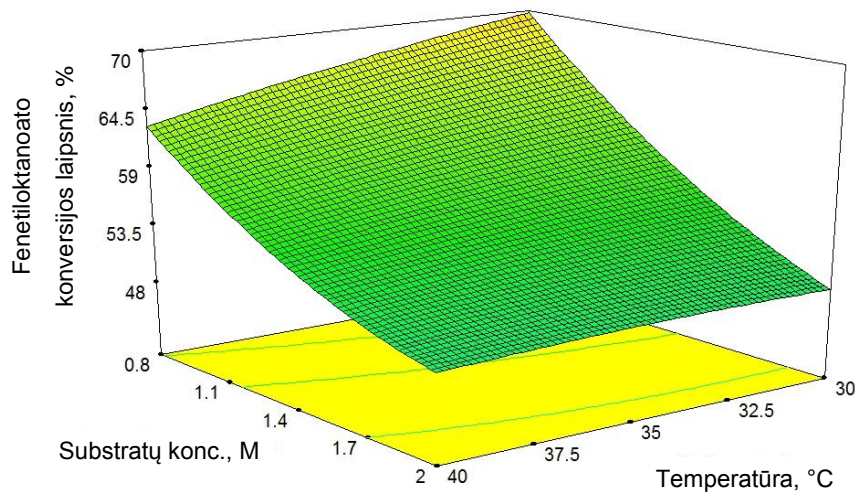


3.60 pav. Atsako paviršiaus modelis: temperatūros ir reakcijos trukmės įtaka feniloktanoato konversijos laipsniui. Fermento koncentracija 4,52 %, substratų koncentracija 1,4 M.

Įdomi bendra reakcijos temperatūros ir substratų koncentracijos įtaka (3.61 pav.): esant didelėms substratų koncentracijoms (2 M) reakcijos temperatūra beveik neturi įtakos reakcijos išėigai, o esant mažoms substrato koncentracijoms temperatūros įtaka žymi (didėjant temperatūrai reakcijos išėiga mažėja). Kokios šio reiškiniio priežastys sunku pasakyti.

Kaip ir galima tikėtis, reakcijos trukmė turi teigiamos įtakos produkto susidarymui, be to, nuo reakcijos pradžios praėjus 120 minučių, konversija vis

dar didėja (3.60 pav.), todėl, siekiant gauti didelę reakcijos išeią, verta apsvarstyti reakcijos pratęsimo klausimą.



3.61 pav. Atsako paviršiaus modelis: temperatūros ir substratų koncentracijos įtaka fenetiloktanoato konversijos laipsniui. Fermento koncentracija 4,52 %, reakcijos trukmė 90 min.

### Optimalių reakcijos sąlygų nustatymas

Reakcijos optimizavimo tikslas buvo maksimizuoti FEO konversijos laipsnį, parenkant kintamųjų vertes iš viso APM plano intervalo. Optimalios nustatytos TK peresterinimo 2-FE reakcijos sąlygos buvo: 7 % fermento koncentracija, 0,8 M substratų koncentracija, reakcijos temperatūra 30 °C, reakcijos trukmė 120 minučių. Prognozuojama išeią buvo 80,6 % (PI<sub>95</sub> 75,5–85,8). Norint patikrinti šį modelį, eksperimentas buvo atliktas nustatytomis optimizuotomis reakcijos sąlygomis, gauta 80,0 % reakcijos išeią, rezultatai gerai koreliuoja su modelio prognozuojama verte.

Lyginant šiame darbe aprašytus duomenis su literatūroje skelbiamais tyrimų duomenimis, kai kvapieji esteriai sintetinami fermentiniu būdu, mano eksperimentų metu gauti dideli konversijos laipsniai. Jungbae ir kt. sintetino įvairius kvapiuosius esterius, naudodami fermentų mišinius. Naudojant 10 mM oktano rūgšties, 20 mM 2-FE koncentracijas ir 2 mg/ml kiekvieno iš fermentų (*Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa* ir *Aspergillus niger*) heksane esterinimo konversija buvo 64 % po 20 reakcijos valandų, [270]. Taigi po

dešimt kartų ilgesnės reakcijos trukmės gauta mažesnė konversija. Katalizatoriaus kiekį reakcijos mišinyje sunku tiesiogiai palyginti, nes minėtų tyrimų metu buvo naudoti liofilizuoti fermentų preparatai, kurių baltymo kiekis ir aktyvumas nepateiktas, o šio disertacinio darbo tyrimų metu – imobilizuotas preparatas. Šiame darbe pateiktos optimizuotos reakcijos sąlygos suteikia galimybę gauti didesnes išeigas, nes ne tik kad didesnis reakcijos konversijos laipsnis (80 %, palyginus su 64 %), bet ir naudojamos 80 kartų didesnės substratų koncentracijos, o reakcijos trukmė trumpesnė dešimt kartų (2 val. palyginus su 20 val.).

Kitų kvapiųjų esterių išeių ir reakcijos sąlygų pavyzdžiai naudojant RML pateikti 1.8 lentelėje. Dažniausiai reakcijoms katalizuoti naudojamos komercinės Lipozyme IM arba Lipozyme RM IM lipazės (imobilizuoti RML Novozymes® preparatai, atitinkamai senesnis ir naujesnis pavadinimai) ir tirpiklis heksanas ar heptanas. Sintezė be tirpiklio beveik visada pasižymi mažesniu konversijos laipsniu, o ypač didelės išeigos gaunamos naudojant ypač mažas substratų koncentracijas, pavyzdžiui 0,06 M [190]. Mažesnė substratų koncentracija ir mano tyrimų atveju lėmė didesnę konversiją. Dažniausiai naudojamos fermento koncentracijos svyruoja nuo 0,3 % iki 17 %, tačiau manoma, kad 17 % fermento koncentracijos naudojimas nėra racionalus dėl jo kainos, nebent preparatas yra ypatingai stabilus jį naudojant pakartotinai. Todėl siekta optimizuoti procesą naudojant mažesnes fermento koncentracijas. Be to, literatūroje aprašytų reakcijų trukmė dažnai svyruoja nuo vienos iki kelių parų, todėl šiame darbe aprašyta optimizuota reakcija, kurios metu naudojama palyginus didelė substratų koncentracija (0,8 M), vidutinė fermento koncentracija (7 %) ir labai trumpa reakcijos trukmė (120 min.) yra konkurencinga ir galėtų būti naudojama didesniems FEO kiekiams sintetinti.

#### **3.5.4 Kokosų aliejaus peresterinimas feniletanolium**

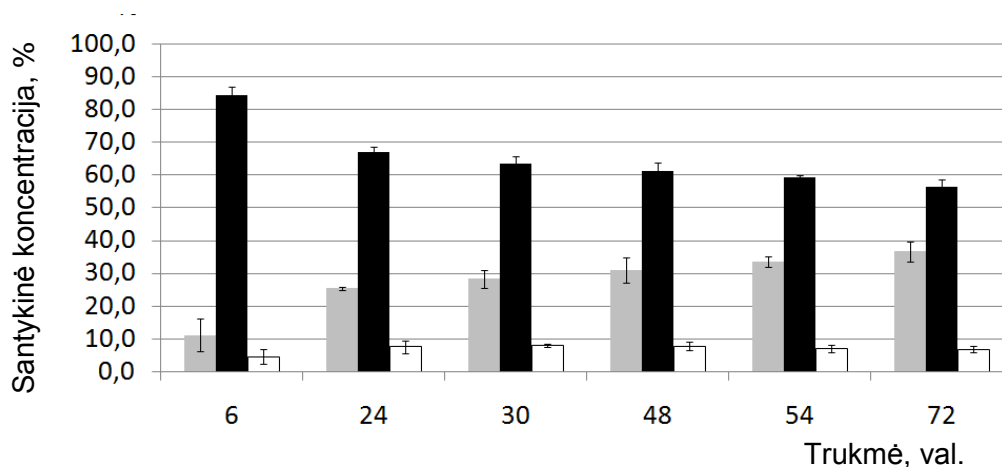
Buvo iširta galimybė naudoti *Rhizomucor miehei* lipazę natūralaus substrato – kokosų aliejaus peresterinimo 2-FE reakcijai be tirpiklio. KA tai vienas populiariausių gamtinių substratų, kuriame gausu oktano rūgšties.



Galimybė išvengti įprastinio tirpiklių vartojimo (substratai tirpsta vienas kitame) suteikia galimybę lengviau išgryninti reakcijos produktus, nes reakcijos mišinį sudaro mažiau komponentų, be to, procesas yra palankesnis aplinką tausojančiai pramoninei gamybai, nes į gamtą neišskiriamos toksiškos medžiagos.

Šiai reakcijai išbandyta skysta fermento forma Palatase®, nes buvo tikimasi gauti geresnį fermento pasiskirstymą santykinai klampiam reakcijos mišinyje, reaktoriuose su maišymo galimybe būtų galima sėkmingai naudoti imobilizuotą lipazę.

Reakcija buvo atlikta dedant alkoholį palaipsniui (tris kartus kas 24 valandas), lygiomis dalimis, pasiekiant alkoholio molinį santykį 6:1 trigliceridų atžvilgiu. Po 72 reakcijos valandų santykinė fenetilo esterių koncentracija pasiekė 37 %, 54 % aliejaus buvo peresterinta (3.62 pav.). Nors ir nebuvo pasiektas toks aukštas peresterinimo laipsnis, kaip naudojant tirpiklį, detalesnis reakcijos sąlygų tyrimas tikriausiai padidintų reakcijos išeigą.



3.62 pav. Kokosų aliejaus peresterinimo 2-FE santykinė reakcijos substratų ir produktų sudėtis naudojant Palatase® (4,2 %) be tirpiklio esant 30 °C.

■ – esterio, ■ – aliejaus, □ – mono-, diacylglicerolių ir riebalų rūgščių santykinė koncentracija.

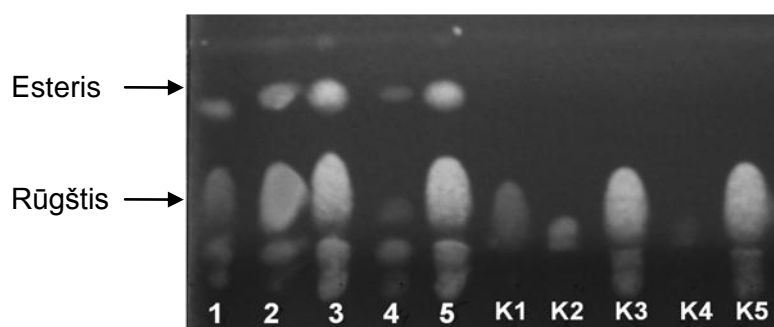
### 3.5.5 Įvairaus grandinės ilgio riebalų rūgščių esterinimas feniletanolium

Atlikus eksperimentus, aprašytus 3.5 skyriuje iškilo klausimas, ar RML gali esterinti 2-FE ilgesnes RR Kai kurių trumpų ir vidutinių RR fenetilo

esterių sintezė naudojant šį fermentą aprašyta Jungbae [270] ir parodyta, kad naudojant *Penicillium roqueforti*, *Candida rugosa* ir *Aspergillus niger* vyksta heksano, oktano, dekano ir dodekano RR mišinio esterinimas alkoholių mišiniu (feniletanolis, 3-fenil-1-propanolis,  $\alpha$ -metilbenzil alkoholis). Kitų autorių duomenimis, RML akyviausia, kai esterinamos rūgštis ir alkoholio suminis anglies atomų skaičius lygus 15 [46]. Buvo pasirinktos ilgesnės skirtingo sotumo laipsnio RR, norint ištirti, ar RML yra aktyvi esterinant ilgesnės grandinės RR aromatinium alkoholiu, o galbūt aktyvaus centro struktūra neleidžia įsikomponuoti dviems santykinai dideliems substratams ir reakcija nevyks. Tirtų riebalų rūgščių sąrašas ir informacija apie jų struktūrą pateikta 3.21 lentelėje.

3.21 lentelė. Riebalų rūgštys, esterintos 2-feniletanolium naudojant RML

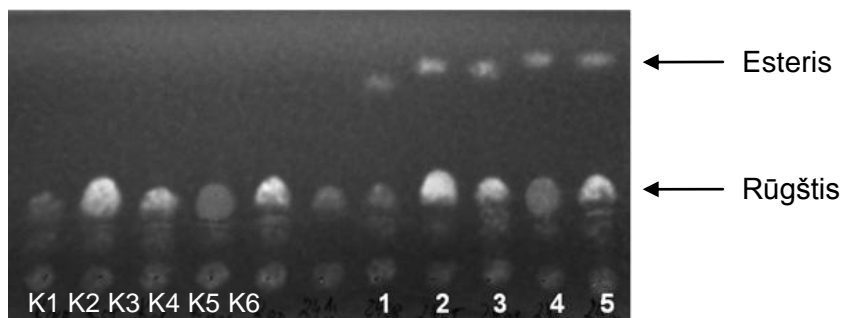
Numeris	Riebalų rūgštis	Sotumas	Anglies atomų : dvišiu rvšiu
1	Kaprilo	Sočioji	C8
2	Stearino	Sočioji	C18
3	Oleino	Nesočioji	C18:1
4	Beheno	Sočioji	C22
5	Eruko	Nesočioji	C22:1



3.63 pav. Skirtingo ilgio ir sotumo laipsnio riebalų rūgščių esterinimo 2-FE reakcijos mišinio sudėties chromatografinis vaizdas. Takeliai: 1 – kaprilo, 2 – stearino, 3 – oleino, 4 – beheno, 5 – eruko rūgščių esterinimo 2-FE produktai. Takeliai K1-K5 atitinkamų rūgščių kontrolės. Substratų koncentracija 1M (molinis santykis 1:1), tirpiklis: heksanas, 30 °C, Fermentas Palatase (4,2 % V/V), reakcijos trukmė 24 val.

3.63 paveiksle matome esterio produkto susidarymą visų tirtų RR atveju, tačiau akivaizdu, kad reakciją apriboja stearino ir beheno (sočiųjų RR) tirpumas heksane (2,4 kaip ir K2 ir K4 takeliuose). Nors vykstant reakcijai ir susidarant esterui šios RR geriau pasiskirsto reakcijos terpėje (2, 4 takelis).

Šių RR tirpumui pagerinti, buvo pakeistos reakcijos sąlygos (vietoj heksano naudotas tirpiklis *t*-butanolis, reakcijos temperatūra 40 °C bei 10 kartų sumažinta substratų koncentracija). Šiuo atveju visos RR ištirpo tirpiklyje ir visais atvejais susidarė fenetilo esteriai (3.64) pav. Taigi, kokybiškai buvo nustatyta, kad RML katalizuojama esterinimo reakcija vyksta tiek naudojant vidutinio ilgio tiek ilgas sočiašias ir nesočiašias riebalų rūgštis.



3.64 pav. Skirtingo ilgio ir sotumo laipsnio riebalų rūgščių esterinimo 2-FE reakcijos mišinio sudėties chromatogafinis atvaizdas. Substratų koncentracija 0,1M (molinis santykis 1:1), tirpiklis: *t*-butanolis, 40 °C, Fermentas Palatase (4,2 % V/V), reakcijos trukmė 24 val. Takeliuose 1 – oktano, 2 – stearino, 3 – Oleino, 4 – beheno, 5 – eruko rūgštys. Takeliuose K1-K5 atitinkamų reakcijos mišinių sudėtis prieš reakciją, K6 – OR ir 2-FE reakcijos mišinys po 24 val. be fermento

### Skyriaus išvados

1. Fenetiloktanoato sintezei atrinkti fermentai Palatase ir Lipozyme RM IM ir tirpiklis – heksanas.
2. Tirta galimybė sintetinti fenetiloktanoatą iš skirtingų substratų: oktano (kaprilo) rūgšties (esterinimas), trikaprilino, kokosų aliejaus (peresterinimas). Po 6 reakcijos valandų pasiektas 75 % konversijos laipsnis naudojant Lipozyme RM IM ir TK substratą heksane, visais atvejais reakcija geriau vyksta heksane. Lipozyme RM IM peresterinimo reakcijų metu yra žymiai efektyvesnis už Palatase. Palatase pakankamai aktyvi (konversijos laipsnis didesnis nei 60 %) tik vykdant esterinimo reakciją heksane.

3. Taikant atsako paviršiaus metodologiją, nustatyta trikaprilino peresterinimo 2-feniletanolio konversijos priklausomybė nuo reakcijos trukmės, temperatūros, alkoholio bei fermento koncentracijos. Optimaliomis prognozuojamomis sąlygomis trikaprilino koncentracija 0,8 M, temperatūra 30 °C, reakcijos trukmė 2 val., fermento koncentracija 7 %, fenetilkaprilato koncentracija 80 %. Lyginant su literatūroje pateiktais duomenimis, toks konversijos laipsnis yra labai geras.
  
4. *Rhizomucor miehei* lipazė yra tinkama įvairaus ilgio (C 8 – C 22) sočioms ir nesočioms riebalų rūgštims esterinti 2-feniletanolio.

## IŠVADOS

1. Imobilizavus *Enterobacter aerogenes* lipazę ant natūralių ir/ar pigių žaliavų pagrindu sukurtų nešiklių pagerėja preparatų katalizinės savybės.
2. Iš tirtų lipazių geriausiai trioleino hidrolizę ir peresterinimą *n*-heksane katalizuoja komercinis lipazės preparatas Palatase®. Perspektyviausi preparatai riebalų rūgščių esterių sintezei yra lipazės iš *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus arrhizus*, *Candida antarctica* (B) mikroorganizmų.
3. Silikagelis yra veiksmingas priedas peresterinimo katalizei naudojant *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei* ir *Rhizopus arrhizus* lipazes, tačiau sulėtina reakciją naudojant *Candida antarctica* B lipazę.
4. Tirtų lipazių specifiskumas skirtingoms acilglicerolių klasėms ir skirtingiems acilglicerolių regioizomerams ženkliai skiriasi. Jų 1,3-specifiskumas monoacilglicerolių atžvilgiu yra žymiai mažiau išreikštas, nei peresterinant triacilglicerolius.
5. Biodyzelino sintezės reakcijoms lipazes tikslinga naudoti etapais: pirmą katalizuojant fermentu, greitai skaldančiu triacilglicerolių esterinius ryšius, o antrą – greitai diacilglicerolius ir monoacilglicerolius peresterinančiu fermentu. Optimali kombinacija: *Rhizopus arrhizus* ir *Candida antarctica* B lipazės.
6. Fenetiloktanoato sintezę geriausiai katalizuoja komercinis lipazės preparatas Lipozyme RM IM® heksane. Didesnis konversijos laipsnis pasiekiamas esant žemesnei temperatūrai ir mažesnėms substratų koncentracijoms.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

1. Šinkūnienė D, Bendikienė V, Juodka B (2011) Response surface methodology-based optimization of lipase-catalyzed triolein hydrolysis in hexane. *Rom Biotech Lett* 16:1–11.
2. Šinkūnienė D, Kiriliauskaitė V, Bendikienė V, Juodka B (2008) Properties and Immobilization of *Enterobacter aerogenes* 13 Lipase. *Rom Biotech Lett* 13:1–8.

Publikacijos nerecenzuojamuose leidiniuose:

1. Kiriliauskaitė, V., Šinkūnienė, D., Bendikienė V. Lipazių katalizuojamų biotechnologijai svarbių procesų tyrimas. Konferencijos “Mokslas Gamtos mokslų fakultete” pranešimai. Vilnius. 2010 m. spalio 22. P. 74-84

## KONFERENCIJOS

1. Konferencija “Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose”. D. Šinkūnienė, V, Bendikienė, P. Adlercreutz. Reakcijos priedų įtaka biodyzelino sintezei naudojant imobilizuotą *Thermomyces lanuginosus* lipazę. Spalio 11d. Stendinis pranešimas. Santrauka konferencijos leidinyje P. 62-65.
2. Konferencija „Mokslas gamtos mokslų fakultete“. V. Kiriliauskaitė, D. Šinkūnienė, V. Bendikienė. Lipazių katalizuojamų biotechnologijai svarbių procesų tyrimas. Spalio 22, 2010, Vilniaus Universiteto Gamtos mokslų fakultetas, Vilnius.
3. XI-toji tarptautinė Lietuvos Biochemikų Draugijos konferencija "LBD 50". D. Šinkūnienė, V. Bendikienė, B. Juodka. Optimization of enzymatic triolein hydrolysis using response surface methodology. Birželio 15-17 d.2010, Tolieja (Molėtų raj.). Stendinis pranešimas. Santrauka konferencijos leidinyje P. 55.

4. International conference on industrial microbiology and applied biotechnology. D. Šinkūnienė, V. Kiriliauskaitė, V. Bendikienė, B. Juodka. Properties and Immobilization of *Enterobacter aerogenes*-13 Lipase. Spalis 9-11, 2008, Galati, Romania. Žodinis pranešimas. Santrauka konferencijos leidinyje, Book of Abstracts, P. 19.

## **PROJEKTAI**

Dėkoju už projektų paramą, disertacijoje pristatyti rezultatai buvo šių projektų dalis:

1. Doktorantūros stažuotė finansuota Lietuvos mokslo tarybos projekto „Studentų mokslinės veiklos skatinimas“ pagal (VP1-3.1-ŠMM-01-V-02-003). Projektas finansuotas pagal Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos 3 prioritetą „Tyrėjų gebėjimų stiprinimas“ iš Europos socialinio fondo ir Lietuvos Respublikos valstybės biudžeto lėšų.
2. Nacionalinė kompleksinė programa BIOTEFA, 1.1.4.1. Naujų biokonversijos procesų, nukreiptų į atsinaujinančių žaliavų perdirbimą, kūrimas: sintezės ir valdymo sistemos. 2012 m. ES struktūrinių fondų parama.
3. Kontroliuojamo degumo ir atsparių senėjimui bioskalių esterių kūrimas ir įvertinimas” (BIOSKALESTER). 2008 - 2010 m. VMSF parama.
4. E!3726 DEGREAS “Optimized complex technology for grease wastes utilization”. 2007-2009 m. Eureka parama.
5. Biokatalizatorių imobilizavimo ir jų panaudojimo biotechnologiniuose procesuose tyrimai (BIOKATALIMA). Projekto koordinatore doc. S. Budrienė (VU ChF, PChK). 2007-2009 m. VMSF parama.
6. Plėtoti naujų biodyzelino ir bioalyvų gamybos naudojant biokatalizatorius technologijų kūrimą. 2007-2009 m. VMSF parama.

## **PADĖKA**

Labai dėkoju savo darbo vadovei dr. Vidai Bendikienei už galimybę dirbti jos komandoje, supažindinimą su lipazių pasauliu, patirties perdavimą, neišsenkančią energiją, supratimą ir palaikymą visais gyvenimo atvejais. Prof. Patrick Adlercreutz, vadovavusiam stažuotei Lundo universitete, dėkoju už didžiulį dėmesį mano projektui ir šiltą bendravimą bei iškilų profesinį pavyzdį.

Dėkoju visiems VU BMBK katedros darbuotojams, o ypač abiem katedros vedėjoms, prof. Vidai Kirvelienei ir prof. Editai Sužiedelienei už dalykinius patarimus ir konsultacijas organizaciniais klausimais, dr. Danutei Labeikytei už konsultacijas elektroforezės klausimais, dr. Sauliui Servai už atidų disertacijos juodraščio perskaitymą, pastabas ir įžvalgas apie minčių formulavimą. Džiaugiuosi, kad galėjau dirbti kartu su kolegomis Vita ir Simu bei doktorantais Lundo universitete, jiems visiems esu dėkinga už gerai praleistą laiką, įdomias diskusijas ir pastebėjimus mokslo ir ne mokslo klausimais. Be to, dėkoju visiems kolegoms ir studentams, kurių vardų čia nepaminėjau, su kuriais kartu teko dirbti VU BMBK.

Dėkoju Aleksandro Stulginskio universiteto Aplinkos ir ekologijos instituto darbuotojams už suteiktą galimybę naudotis dujų chromatografijos-masių spektrometrijos ir aukšto slėgio skysčių chromatografijos įranga.

Esu be galo dėkinga tėvams ir seneliams už meilę ir palaikymą, už neįvardijamą skaičių išmokytų dalykų, ir gebėjimų ugdymą nuo mažens. Savo vyrui Rimvydui ir vaikams Viltei ir Gaudeniui giliai dėkoju už meilę ir atsidavimą bei suteiktą galimybę atlikti šį darbą.



## LITERATŪRA

1. Kapoor M, Gupta MN (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem* 47:555–569.
2. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, Goldman A (1992) The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Eng* 5 :197–211.
3. Schrag JD, Cygler M (1997) Lipases and  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. In: Rubin B, Denis EA (eds) *Methods in Enzymology, Lipases, Part A Biotechnology*. Academic Press, pp 85–107
4. Nardini M, Dijkstra BW (1999)  $\alpha/\beta$  Hydrolase fold enzymes : the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9:732–737.
5. Dodson GG (1992) Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss* 93:95–105.
6. Schmid RD, Verger R (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chemie Int Edit* 37:1608–1633.
7. Carrasco-López C, Godoy C, de las Rivas B, Fernández-Lorente G, Palomo JM, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, Martínez-Ripoll M, Hermoso JA (2009) Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J Biol Chem* 284:4365–4372.
8. Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2:293–308.
9. Pleiss J, Fischer M, Schmid RD (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* 93:67–80.
10. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S, Turkenburg JP, Christiansen L, Høge-Jensen B, Nørskov L (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343:767–770.
11. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53:315–351.
12. Gandhi NN, Patil NS, Sawant SB, Joshi JB, Wangikar PP, Mukesh D (2000) Lipase-catalyzed esterification. *Cataly Rev* 42:439–480.
13. Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Sandström AG, Bäckvall J-E, Mowbray SL (2008) X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *J Mol Biol* 376:109–19.
14. Ali Y Ben, Verger R, Abousalham A (2012) Lipases or esterases : does it really matter? Toward a new bio-physico-chemical classification. In: Sandoval G (ed) *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 31–51
15. Nagarajan S (2012) New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Appl Biochem Biotech* 168:1163–96.
16. Aloulou A, Rodriguez J a, Fernandez S, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carrière F (2006) Exploring the specific features of interfacial

- enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys Acta* 1761:995–1013.
17. Peters GH, Olsen OH, Svendsen a, Wade RC (1996) Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in *Rhizomucor miehei* lipase. *Biophys J* 71:119–29.
  18. Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5:173–85.
  19. Hult K, Berglund P (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol* 25:231–238.
  20. Kazlauskas RJ (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 9:195–201.
  21. Adlercreutz P (2013) Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev* 42:6406–6436.
  22. Joseph B, Ramteke PW, Thomas G (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* 26:457–470.
  23. Koops BC, Verheij HM, Slotboom AJ, Egmond MR (1999) Effect of chemical modification on the activity of lipases in organic solvents. *Enzyme Microb Tech* 25:622–631.
  24. Treichel H, Oliveira D, Mazutti M a., Luccio M, Oliveira JV (2009) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Tech* 3:182–196.
  25. Singh AK, Mukhopadhyay M (2012) Overview of fungal lipase: a review. *Appl Biochem Biotech* 166:486–520.
  26. Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotech* 118:155–70.
  27. Wang L, Chi Z, Wang X, Liu Z, Li J (2007) Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Ann Microbiol* 57:495–501.
  28. Pandey A (2006) Enzyme Technology. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C (eds) Springer, p 742
  29. Novozymes. Web page (2010). <http://www.novozymes.com>. Accessed 8 Aug 2013
  30. Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Tech* 39:235–251.
  31. Fernandes MLM, Krieger N, Baron AM, Zamora PP, Ramos LP, Mitchell DA (2004) Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *J Mol Catal B-Enzym* 30:43–49.
  32. Rodrigues RC, Godoy CA, Volpato G, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2009) Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. *Process Biochem* 44:963–968.
  33. Fernandez-Lafuente R (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B-Enzym* 62:197–212.

34. Novozymes. Enzymes Produced by GMM (2010). <http://www.novozymes.com/>. Accessed 1 Sep 2013
35. Wannerberger K, Welin-Klintström S, Arnebrant T (1997) Activity and adsorption of lipase from *Humicola lanuginosa* on surfaces with different wettabilities. *Langmuir* 13:784–790.
36. Christensen MW, Andersen L, Husum TL, Kirk O (2003) Industrial lipase immobilization. *Eur J Lipid Sci Tech* 105:318–321.
37. Holm HC, Cowan D (2008) The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. *Eur J Lipid Sci Tech* 110:679–691.
38. Rønne TH, Pedersen LS, Xu X (2005) Triglyceride selectivity of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 82:737–743.
39. Jha BK, Svensson M, Kronberg B, Holmberg K (1999) Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. *J Colloid Interf Sci* 213:262–264.
40. Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R (2003) General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4:1–6.
41. Moskowitz GJ, Cassaigne R, West IR, Shen T, Feldman LI (1977) Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with *Mucor miehei* esterase. Properties of the enzyme. *J Agr Food Chem* 25:1146–1150.
42. Peters GH, van Aalten DM, Svendsen A, Bywater R (1997) Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length. *Protein Eng* 10:149–158.
43. Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *J Mol Catal B-Enzym* 64:1–22.
44. Wu XY, Jääskeläinen S, Linko Y-Y (1996) An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme Microb Tech* 19:226–231.
45. Hüge-Jensen B, Galluzzo DR, Jensen RG (1988) Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. *J Am Oil Chem Soc* 65:905–910.
46. Bruno LM, de Lima Filho JL, de M Melo EH, de Castro HF (2004) Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehei* lipase immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. *Appl Biochem Biotech* 113-116:189–99.
47. Soumanou MM, Bornscheuer UT (2003) Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 105:656–660.
48. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Tech* 40:1451–1463.
49. Böttcher D, Bornscheuer UT (2010) Protein engineering of microbial enzymes. *Curr Opin Microbiol* 13:274–82.

50. Domínguez de María P, Carboni-Oerlemans C, Tuin B, Bargeman G, van der Meer A, van Gemert R (2005) Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *J Mol Catal B-Enzym* 37:36–46.
51. Høegh I, Patkar S, Halkier T, Hansen MT (1995) Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Can J Botany* 73:869–875.
52. Idris A, Bukhari A (2012) Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol Adv* 30:550–63.
53. Larios A, García HS, Oliart RM, Valerio-Alfaro G (2004) Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl Microbiol Biot* 65:373–376.
54. Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Hari Krishna S (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol* 20:433–437.
55. Palomo JM, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fuentes M, Fernández-Lafuente R, Guisan JM (2002) Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering. Kinetic resolution of (±)- $\alpha$ -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron-Asymmetr* 13:1337–1345.
56. Haraldsson GG, Gudmundsson BÖ, Almarsson Ö (1995) The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron* 51:941–952.
57. Irimescu R, Furihata K, Hata K, Iwasaki Y, Yamane T (2001) Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol. *J Am Oil Chem Soc* 78:285–290.
58. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38:453–68.
59. Chen B, Hu J, Miller EM, Xie W, Cai M, Gross RA (2008) *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* 9:463–471.
60. Zhao H, Song Z (2010) Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids. *Biochem Eng J* 49:113–118.
61. Ellis JJ (1985) *Rhizopus arrhizus-Rhizopus oryzae* group as indicated by their DNA complementarity. 77:243–247.
62. The University of Adelaide (2013) Mycology online. In: *Rhizopus oryzae*. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R\\_oryzae.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html). Accessed 14 Aug 2013
63. Sigma Aldrich (2013) <http://www.sigmaaldrich.com/>. Accessed 14 Aug 2013

64. Du W, Xu Y-Y, Liu D-H, Li Z-B (2005) Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *J Mol Catal B-Enzym* 37:68–71.
65. Wang Y, Shen X, Li Z, Li X, Wang F, Nie X, Jiang J (2010) Immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system. *J Mol Catal B-Enzym* 67:45–51.
66. Kohno M, Funatsu J, Mikami B, Kigimiya W, Matruo T, Morita Y (1996) The crystal resolution structure of lipase II from *Rhizopus niveus* at 2 . 2 Å. *Biochemistry-US* 35:505–510.
67. Kohno M, Enatsu M, Yoshiizumi M, Kugimiya W (1999) High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expres Purif* 15:327–335.
68. Leibniz Institute (2013) DSMZ, Procariotic Nomenclature Up-to-date. <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/>. Accessed 14 Aug 2013
69. Jaeger K-E, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16:396–403.
70. Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE, Dijkstra BW (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem* 275:31219–25.
71. Chung GH, Lee YP, Jeon GH, Yoo OJ, Rhee JS (1991) Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agric Biol Chem Tokyo* 55:2359–2365.
72. Kulkarni N, Gadre R V (2002) Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J Ind Microbiol Biot* 28:344–8.
73. Luković N, Knežević-jugović Z, Bezbradica D (2009) Biodiesel fuel production by enzymatic transesterification of oils: recent trends, challenges and future perspectives.
74. Kim KR, Kwon DY, Yoon SH, Kim WY, Kim KH (2005) Purification, refolding, and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expres Purif* 39:124–9.
75. Fernández-Lorente G, Palomo JM, Fuentes M, Mateo C, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2003) Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnol Bioeng* 82:232–7.
76. Jinwal UK, Roy U, Chowdhury AR, Bhaduri a P, Roy PK (2003) Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorgan Med Chem* 11:1041–6.
77. Bendikienė V, Surinėnaitė B, Bachmatova I, Marcinkevičienė L, Juodka B (2005) The specificity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase . Hydrolysis. *Biologija* 27–30.
78. Surinenaite B, Bendikiene V, Juodka B, Bachmatova I, Marcinkevichiene L (2002) Characterization and physicochemical properties of a lipase from *Pseudomonas mendocina* 3121–1. *Biotechnol Appl Bioc* 36:47–55.

79. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Sci Tech* 102:133–153.
80. Hasan F, Shah AA, Hameed A, Shan AA (2009) Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* 27:782–98.
81. Smeltzer MS, Hart ME, Iandolo JJ (1992) Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. *Appl Environ Microb* 58:2815–9.
82. Jaeger K-E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15:29–63.
83. Shelley AW, Deeth HC, MacRae IC (1987) A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *J Appl Microbiol* 62:197–207.
84. Kouker G, Jaeger K-E (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microb* 53:211–213.
85. Moncla BJ, Pryke KM (2009) Oleate lipase activity in *Gardnerella vaginalis* and reconsideration of existing biotype schemes. *BMC Microbiol* 9:78.
86. Hoppe A, Theimer RR (1997) Enzymes for lipolysis and fatty acid metabolism in different organelle fractions from rape seed cotyledons. 49:
87. Duncombe WG (1963) The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem J* 88:7.
88. Hendrickson HS (1994) Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. *Anal Biochem* 219:1.
89. Duque M, Graupner M, Stütz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A (1996) New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 37:868–876.
90. Beisson F, Ferté N, Nari J, Noat G, Arondel V, Verger R (1999) Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Lipid Res* 40:2313–21.
91. Kovacs P, Csaba G (1999) Fluorimetric analysis of phospholipase activity in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Bioscience Rep* 19:81–87.
92. Schmidt M, Bornscheuer UT (2005) High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng* 22:51–56.
93. Zinterhofer L, Wardlaw S, Jatlow P, Seligson D (1973) Nephelometric determination of pancreatic enzymes II. Lipase. *Clin Chim Acta* 44:173–178.
94. Maurich V, Zacchigna M, Pitotti A (1991) *p*-nitrophenyllaurate: a substrate for the high-performance liquid chromatographic determination of lipase activity. *J Chromatogr B* 566:453–459.
95. Balashev K, Gudmand M, Iversen L, Callisen TH, Svendsen A, Bjørnholm T (2003) *Humicola lanuginosa* lipase hydrolysis of mono-oleoyl-rac-glycerol at the lipid–water interface observed by atomic force microscopy. *BBA-Biomembranes* 1615:93–102.

96. Walde P, Luisi PL (1989) A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry-US* 28:3353–3360.
97. Gomori G (1945) The microtechnical demonstration of sites of lipase activity. *Exp Biol Med* 58:362–364.
98. Menon GK, Ghadially R, Williams ML, Elias PM (1992) Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: Implications for normal and abnormal desquamation. *Brit J Dermatol* 126:337–345.
99. Ge K, Liu DH, Chen K, Nie LH, Yao SZ (1995) Assay of pancreatic lipase with the surface acoustic wave sensor system. *Anal Biochem* 226:207–211.
100. Yahya ARM, Anderson WA, Moo-Young M (1998) Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb Tech* 23:438–450.
101. Damstrup ML, Jensen T, Sparsø F V, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X (2006) Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in *tert*-pentanol: Process optimization by response surface methodology. *J Am Oil Chem Soc* 83:27–33.
102. Villeneuve P (2007) Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol Adv* 25:515–36.
103. Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C (2009) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 102:1–8.
104. Kuo SJ, Parkin KL (1996) Solvent polarity influences product selectivity of lipase-mediated esterification reactions in microaqueous media. *J Am Oil Chem Soc* 73:1427–1433.
105. Yang B, Kuo S-J, Hariyadi P, Parkin KL (1994) Solvent suitability for lipase-mediated acyl-transfer and esterification reactions in microaqueous milieu is related to substrate and product polarities. *Enzyme Microb Tech* 16:577–583.
106. Narayan VS, Klivanov AM (1993) Are water-immiscibility and apolarity of the solvent relevant to enzyme efficiency? *Biotechnol Bioeng* 41:390–393.
107. Therisod M, Klivanov AM (1986) Facile enzymatic preparation of monoacylated sugars in pyridine. *J Am Chem Soc* 108:5638–5640.
108. Secundo F, Carrea G (2002) Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *J Mol Catal B-Enzym* 19-20:93–102.
109. Zaks A, Klivanov AM (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* 263:8017–21.
110. Trodler P, Pleiss J (2008) Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struct Biol* 8:9.
111. Park S, Kazlauskas RJ (2003) Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Curr Opin Biotech* 14:432–437.
112. Basheer S, Mogi K, Nakajima M (1995) Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty acids. *Biotechnol Bioeng* 45:187–195.

113. Triantafyllou AÖ, Wehtje E, Adlercreutz P, Mattiasson B (1995) Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol Bioeng* 45:406–414.
114. Griebenow K, Klibanov AM (1996) On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *J Am Chem Soc* 118:11695–11700.
115. Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B (1988) On the importance of the support material for bioorganic synthesis. *Eur J Biochem* 172:573–578.
116. Halling PJ (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Tech* 16:178–206.
117. Halling PJ (1990) High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. *BBA-Protein Struct M* 1040:225–228.
118. Chowdary G V, Prapulla SG (2002) The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochem* 38:393–397.
119. Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z (2009) Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technol* 100:5146–5154.
120. Tamalampudi S, Talukder MR, Hama S, Numata T, Kondo A, Fukuda H (2008) Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochem Eng J* 39:185–189.
121. Bousquet-Dubouch M-P, Graber M, Sousa N, Lamare S, Legoy M-D (2001) Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *BBA-Protein Struct M* 1550:90–99.
122. Lee C-HH, Parkin KL (2001) Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. *Biotechnol Bioeng* 75:219–227.
123. Liu KK-C, Nozaki K, Wong C-H (1990) Problems of acyl migration in lipase-catalyzed enantioselective transformation of meso-1,3-diol systems. *Biocatal Biotransfor* 3:169–177.
124. Laszlo J a., Compton DL, Vermillion KE (2008) Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 85:307–312.
125. Serdarevich B (1967) Glyceride isomerizations in lipid chemistry. *J Am Oil Chem Soc* 44:381–393.
126. Sjursnes BJ, Anthonsen T (1994) Acyl migration in 1,2-dibutyryn dependence on solvent and water activity. *Biocatal Biotransfor* 9:285–297.
127. Fischer E (1920) Wanderung von acyl bei den glyceriden. *Archiv Pharm Bericht* 53:1621–1633.
128. Kodali DR, Tercyak A, Fahey DA, Small DM (1990) Acyl migration in 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol. *Chem Phys Lipids* 52:163–170.



129. Millqvist Fureby A, Virto C, Adlercreutz P, Mattiasson B (1996) Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatal Biotransfor* 14:89–111.
130. Millqvist Fureby A, Adlercreutz P, Mattiasson B (1996) Acyl migration and its implications in lipid modifications. *Ann NY Acad Sci* 799:231–237.
131. Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, Fukuda H (2005) Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochem Eng J* 23:45–51.
132. Seitz EW (1974) Industrial application of microbial lipases: a review. *J Am Oil Chem Soc* 51:12–6.
133. Dhake KP, Thakare DD, Bhanage BM (2013) Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Fragr J* 28:71–83.
134. Bornscheuer UT (2000) *Enzymes in lipid modification*. Wiley-VCH Weinheim, Germany
135. Chandler I, Quinlan P, McNeill G (1998) Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides. *J Am Oil Chem Soc* 75:1513–1518.
136. Soumanou MM, Bornscheuer UT, Schmid RD (1998) Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides. *J Am Oil Chem Soc* 75:703–710.
137. Xu X (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur J Lipid Sci Tech* 102:287–303.
138. Chen CS, Wu SH, Girdaukas G, Sih CJ (1987) Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. *J Am Chem Soc* 109:2812–2817.
139. Damstrup ML, Jensen T, Sparsø F V, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X (2005) Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. *J Am Oil Chem Soc* 82:559–564.
140. Sonntag NO V (1984) New developments in the fatty acid industry in America. *J Am Oil Chem Soc* 61:229–232.
141. Watanabe T, Shimizu M, Sugiura M, Sato M, Kohori J, Yamada N, Nakanishi K (2003) Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase lipozyme RM IM. *J Am Oil Chem Soc* 80:1201–1207.
142. Rosu R, Yasui M, Iwasaki Y, Yamane T (1999) Enzymatic synthesis of symmetrical 1, 3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *J Am Oil Chem Soc* 76:839–843.
143. Kobayashi S (2010) Lipase-catalyzed polyester synthesis – A green polymer chemistry. *P Jpn Acad B-Phys* 86:338–365.
144. Okumira S, Iwai M, Tominaga Y (1984) Synthesis of ester oligomer by *Aspergillus niger* lipase. *Agric Biol Chem Tokyo* 48:2805–2808.
145. Knani D, Gutman AL, Kohn DH (1993) Enzymatic polyesterification in organic media. Enzyme-catalyzed synthesis of linear polyesters. I.

- Condensation polymerization of linear hydroxyesters. II. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone. *J Polym Sci Pol Chem* 31:1221–1232.
146. Kobayashi S, Uyama H (1993) Enzymatic polymerization of cyclic acid anhydrides and glycols by a lipase catalyst. *Die Makromol Chemie, Rapid Commun* 14:841–844.
  147. Barrera-Rivera KA, Flores-carreón A, Martínez-richa A (2012) Lipases and Phospholipases. In: Sandoval G (ed) *Lipases and Phospholipases*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 485–493
  148. Mhaskar SY, Lakshminarayana G, Saisree L (1993) N-acyl-L-leucines of biologically active uncommon fatty acids: Synthesis and antibacterial activity. *J Am Oil Chem Soc* 70:23–27.
  149. Figueroa-Espinoza M-C, Villeneuve P (2005) Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J Agr Food Chem* 53:2779–2787.
  150. Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN (2001) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur J Lipid Sci Tech* 103:655–660.
  151. Kontogianni A, Skouridou V, Sereti V, Stamatis H, Kolisis FN (2003) Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J Mol Catal B-Enzym* 21:59–62.
  152. Alissandratos A, Halling PJ (2012) Enzymatic acylation of starch. *Bioresource Technol* 115:41–47.
  153. Masum BM, Masjuki HH, Kalam M a., Rizwanul Fattah IM, Palash SM, Abedin MJ (2013) Effect of ethanol–gasoline blend on NO<sub>x</sub> emission in SI engine. *Renew Sust Energ Rev* 24:209–222.
  154. Eurostat Press Office (2013) Eurostat news release.
  155. Colesca SE, Ciocoiu CN (2013) An overview of the Romanian renewable energy sector. *Renew Sust Energ Rev* 24:149–158.
  156. Lietuvos respublikos Seimas (2011) Lietuvos respublikos atsinaujinančių išteklių energetikos įstatymas 2011. Valstyb žinios
  157. Nasir NF, Daud WRW, Kamarudin SK, Yaakob Z (2013) Process system engineering in biodiesel production: A review. *Renew Sust Energ Rev* 22:631–639.
  158. Mousdale DM (2008) *Biofuels: biotechnology, chemistry, and sustainable development*. Taylor & Francis
  159. (2011) *Renewables 2011, Global status report*. Renewable energy policy network for the 21st century
  160. European Commission (2012) Proposal for a directive of the European parliament and of the council 2012/0288 (COD). 0288:
  161. U.S. Environmental Protection Agency (2002) *Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions Draft Technical Report*. 1–118.
  162. Central European Committee for Standartization. <http://www.cen.eu/cen/pages/default.aspx>. Accessed 11 Jul 2013
  163. Robles-Medina A, González-Moreno P a, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E (2009) Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol Adv* 27:398–408.

164. Sawangkeaw R, Ngamprasertsith S (2013) A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renew Sust Energ Rev* 25:97–108.
165. Canakci M, Sanli H (2008) Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biot* 35:431–441.
166. Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M (2012) Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sust Energ Rev* 16:143–169.
167. Karmakar A, Karmakar S, Mukherjee S (2010) Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresource Technol* 101:7201–10.
168. Liang M-H, Jiang J-G (2013) Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Prog Lipid Res* 52:395–408.
169. Nguyen N, Demirel Y (2010) Retrofit of distillation columns in biodiesel production plants. *Energy* 35:1625–1632.
170. Nielsen PM, Brask J, Fjerbaek L (2008) Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. *Eur J Lipid Sci Tech* 110:692–700.
171. Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D (2008) Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biot* 79:331–337.
172. Piedmont biofuels (2013) Piedmont biofuels. 1–7.
173. Antczak MS, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S (2009) Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renew Energ* 34:1185–1194.
174. Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V (2005) Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J Biotechnol* 119:291–299.
175. Watanabe Y, Pinsirodom P, Nagao T, Yamauchi A, Kobayashi T, Nishida Y, Takagi Y, Shimada Y (2007) Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Mol Catal B-Enzym* 44:99–105.
176. Belafi-Bako K, Kovacs F, Gubicza L, Hancsok J (2002) Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. *Biocatal Biotransfor* 20:437–439.
177. Xu Jing Zeng, Dehua Liu, Yuanyuan W Du (2004) Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium. *Biocatal Biotransfor* 22:45–48.
178. Al-Zuhair S (2007) Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuel Bioprod Bior* 1:57–66.
179. Vieira APA, Silva MAP, Langone MAP (2006) Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. *Lat Am Appl Res* 288:283–288.

180. Longo MA, Sanromán MA (2006) Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol Biotech* 44:335–353.
181. Schrader J, Etschmann MMW, Sell D, Hilmer J, Rabenhorst J (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. 463–472.
182. Hamsaveni DR, Prapulla SG, Divakar S (2001) Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochem* 36:1103–1109.
183. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2009) *Food Chemistry*, 4th ed. 4th ed. Springer, Berlin-Heidelberg, p 1077
184. Athawale V, Manjrekar N, Athawale M (2003) Effect of reaction parameters on synthesis of citronellyl methacrylate by lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Prog* 19:298–302.
185. Mimoun H (1996) Catalytic opportunities in the flavor and fragrance industry. *Universite de Lausanne, CHIMIA* 50:620–625.
186. Chapuis C, Jacoby D (2001) Catalysis in the preparation of fragrances and flavours. *Appl Catal A-Gen* 221:93–117.
187. Batte MT, Beaverson J, Hooker NH, Haab T (2007) Putting their money where their mouths are: Consumer willingness to pay for multi-ingredient, processed organic food products. *Food Policy* 32:145–159.
188. Ved JJ, Pai JS (1996) Preparation of short chain esters by the lipase from *Mucor miehei* using heptane and silica gel. *Biotechnol Tech* 10:855–856.
189. Karagoz B, Bayramoglu G, Altintas B, Bicak N, Arica MY (2010) Poly(glycidyl methacrylate)-polystyrene diblocks copolymer grafted nanocomposite microspheres from surface-initiated atom transfer radical polymerization for lipase immobilization: application in flavor ester synthesis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49:9655–9665.
190. Hari Krishna S, Divakar S, Prapulla SG, Karanth NG (2001) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *J Biotechnol* 87:193–201.
191. Hari Krishna S, Prapulla SG, Karanth NG (2000) Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate using immobilized *Rhizomucor miehei* lipase in non-aqueous media. *J Ind Microbiol Biot* 25:147–154.
192. Chowdary G V, Ramesh MN, Prapulla SG (2000) Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochem* 36:331–339.
193. Bourg-Garros S, Razafindramboa N, Pavia AA (1997) Synthesis of (Z)-3-hexen-1-yl butyrate in hexane and solvent-free medium using *Mucor miehei* and *Candida antarctica* lipases. *J Am Oil Chem Soc* 74:1471–1475.
194. De BK, Chatterjee T, Bhattacharyya DK (1999) Synthesis of geranyl and citronellyl esters of coconut oil fatty acids through alcoholysis by *Rhizomucor miehei* lipase catalysis. *J Am Oil Chem Soc* 76:1501–1504.

195. Majumder AB, Shah S, Gupta MN (2007) Enantioselective transacetylation of (R,S)-beta-citronellol by propanol rinsed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Chem Cent J* 1:10.
196. Parchem (2013) Parchem katalogas. In: *Fine Spec Chem*.
197. Shmuel Y (2010) *Dictionary of Food Compounds, Second Edition, 2010*. CRC Press
198. Moreno J a, Zea L, Moyano L, Medina M (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control* 16:333–338.
199. Camciuc M, Bessièrè JM, Vilarem G, Gaset A, Marie J, Re B, Vilarem R (1998) Volatile components in okra seed coat. *Phytochemistry* 48:311–315.
200. El-Sayed AM (2009) The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com/>.
201. Bojović S, Nikolić B, Ristić M, Orlović S, Veselinović M, Rakonjac L, Dražić D (2011) Variability in chemical composition and abundance of the rare tertiary relict *Pinus heldreichii* in Serbia. *Chem Biodivers* 8:1754–1765.
202. Tan HSG, Yu B, Curran P, Liu SQ (2011) Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream. *Food Chem* 124:80–84.
203. Liu S-Q, Holland R, Crow VL (2004) Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int Dairy J* 14:923–945.
204. Brena BM, Batista-Viera F (2006) Immobilization of enzymes. *Immobilization of enzymes and cells*. Springer, pp 15–30
205. Knežević ZD, Šiler-Marinković SS, Mojović L V (2004) Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta Periodica Technologica* 151–164.
206. Zheng M-M, Lu Y, Dong L, Guo P-M, Deng Q-C, Li W-L, Feng Y-Q, Huang F-H (2012) Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. *Bioresource Technol* 115:141–146.
207. Bornscheuer UT, Kazlauskas RJ (2005) Lipases and Esterases: Sections 5.3 - 5.4. *Hydrolases in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 141–183
208. Persson M, Mladenoska I, Wehtje E, Adlercreutz P (2002) Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb Tech* 31:833–841.
209. Basso A, Braiuca P, Cantone S, Ebert C, Linda P, Spizzo P, Caimi P, Hanefeld U, Degrassi G, Gardossi L (2007) In Silico Analysis of Enzyme Surface and Glycosylation Effect as a Tool for Efficient Covalent Immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads®. *Adv Synth Catal* 349:877–886.
210. Goldstein L (1972) Microenvironmental effects on enzyme catalysis. Kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin. *Biochemistry-US* 11:4072–4084.

211. Guisan J, Alvaro G, Fernandez-Lafuente R (1994) Industrial design of enzymic processes catalysed by very active immobilized derivatives: utilization of diffusional limitations (gradients of pH) as a profitable tool in enzyme engineering. *Biotechnol Appl Bioc* 20:357–369.
212. Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2000) Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Tech* 26:509–515.
213. Okahata Y, Mori T (1997) Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media. *Trends Biotechnol* 15:50–54.
214. Verma ML, Barrow CJ, Puri M (2013) Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Appl Microbiol Biot* 97:23–39.
215. Pavlidis I V, Vorhaben T, Gournis D, Papadopoulos GK, Bornscheuer UT, Stamatis H (2012) Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *J Nanopart Res* 14:1–10.
216. Wang P (2006) Nanoscale biocatalyst systems. *Curr Opin Biotech* 17:574–579.
217. Kim J, Jia H, Wang P (2006) Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnol Adv* 24:296–308.
218. Safarik I, Safarikova M (2009) Magnetic nano-and microparticles in biotechnology. *Chem Pap* 63:497–505.
219. Bendikene VG, Iuodka BA, Kazlauskas RM, Tautkus CA, Matulionis, EA SA (1995) Immobilization of enzymes on carriers with magnetic properties. Preparation and characterization of magnetic derivatives of chitin (Magnetic chitin carriers for enzymes). *Appl Biochem Microbiol* 31:335–340.
220. Amulevicius A, Baltrunas D, Bendikiene V, Daugvila A, Davidonis R, Mazeika K (2002) Investigation of the Magnetic Properties of Nanocrystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Precipitated on the Surface of Chitin. *Phys status solidi* 189:243–252.
221. Romaškevič T, Budrienė S, Liubertienė A, Gerasimčik I, Zubrienė A, Dienys G (2007) Synthesis of chitosan-graft-poly(ethylene glycol)methyl ether methacrylate copolymer and its application for immobilization of maltogenase. 18:33–38.
222. Budriene S, Romaskevicius T, Pielichowski K, Pielichowski J (2007) Synthesis and characterization of polyurethane microspheres and their application for immobilization of maltogenase. *Polym Advan Technol* 18:67–71.
223. Maruška AS, Liesienė J, Šėrys A (1993) Celiuliozinio gelio gavimo būdas. Patentas nr. 2299.
224. Hagström AE V, Nordblad M, Adlercreutz P (2009) Biocatalytic polyester acrylation—process optimization and enzyme stability. *Biotechnol Bioeng* 102:693–699.

225. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
226. Fernández CM, Martín VC (1977) Preparation d'un tampon universel de force ionique 0,3 M. *Talanta* 24:747–748.
227. Britton HTS, Robinson RA (1931) Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J Chem Soc* 1456–1462.
228. Scanlon JT, Willis DE (1985) Calculation of flame ionization detector relative response factors using the effective carbon number concept. *J Chromatogr Sci* 23:333–340.
229. Verhaar LAT, Wilt HGJ (1964) The gas chromatographic determination of polyhydroxy monocarbonic acids obtained by oxygenation of-hexoses in aqueous alkaline solutions. *J Chromatogr A* 41:168–179.
230. Krajewska B (2004) Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Tech* 35:126–139.
231. Aucoin MG, Erhardt F a, Legge RL (2004) Hyperactivation of *Rhizomucor miehei* lipase by hydrophobic xerogels. *Biotechnol Bioeng* 85:647–55.
232. Filice M, Marciello M, Betancor L, Carrascosa A V, Guisan JM, Fernandez-Lorente G (2011) Hydrolysis of fish oil by hyperactivated *Rhizomucor miehei* lipase immobilized by multipoint anion exchange. *Biotechnol Prog* 27:961–8.
233. Martinek K, Klibanov AM, Goldmacher VS, Berezin I V (1977) The principles of enzyme stabilization I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion. *BBA-Enzymology* 485:1–12.
234. Kumari A, Mahapatra P, Kumar GV, Banerjee R (2008) Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioproc Biosyst Eng* 31:291–8.
235. Kumari A, Mahapatra P, Garlapati VK, Banerjee R (2009) Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology for Biofuels* 2:1.
236. Čipinytė V, Grigiškis S, Baškys E (2009) Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologija* 55:84–92.
237. Gandhi N (1997) Applications of lipase. *J Am Oil Chem Soc* 74:621–634.
238. Hasan F, Shah AA, Javed S, Hameed A (2010) Enzymes used in detergents : Lipases. 9:4836–4844.
239. Mustranta A, Forssell P, Poutanen K (1993) Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microb Tech* 15:133–139.
240. Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P (1997) Adsorption of lipase on polypropylene powder. *BBA-Lipid Lipid Met* 1345:188–196.
241. Hermansyah H, Wijanarko A, Gozan M, Surya RAT, Utami MK, Shibasaki-Kitakawa N, Yonemoto T (2007) Consecutive reaction model for triglyceride hydrolysis using lipase. *Jurnal Teknologi* 2:151–157.

242. Long K (2010) Unlocking the Miracle of Lipases, 1st ed. In: Long K (ed) 1st ed. Malaysian Agricultural Research and Development Institute, Kuala Lumpur, p 22
243. Montgomery D (2005) Design and Analysis of Experiments, 6th ed. John Wiley & Sons, New York
244. Levišauskas D, Tekorius T (2007) Eksperimentinių tyrimų planavimas. Technologija, Kaunas, p 92
245. Bilyk A, Bistline RG, Haas JMJ, Fearheller SH, Haas MJ (1991) Lipase-catalyzed triglyceride hydrolysis in organic solvent. *J Am Oil Chem Soc* 68:320–323.
246. Sendžikienė E (2005) Daktaro disertacija. Žemės ūkio kilmės riebalinių atliekų panaudojimas biodyzelino gamyboje. Aleksandro Stulginskio Universitetas
247. Feddern V (2010) Animal Fat Wastes for Biodiesel Production.
248. Salis A, Sanjust E, Solinas V, Monduzzi M (2003) Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. *J Mol Catal B-Enzym* 24–25:75–82.
249. Barros RJ, Wehtje E, Garcia FAP, Adlercreutz P (1998) Physical characterization of porous materials and correlation with the activity of immobilized enzyme in organic medium. *Biocatal Biotransfor* 16:67–85.
250. Wang Y, Wu H, Zong MH (2008) Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technol* 99:7232–7237.
251. Pérignon M, Lecomte J, Pina M, Renault A, Simonneau-Deve C, Villeneuve P (2013) Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B lipases in interesterification reactions: effect of the aqueous microenvironment. *J Am Oil Chem Soc* 90:1151–1156.
252. Rodrigues RC, Pessela BCCC, Volpato G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Ayub M a. ZZ (2010) Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem* 45:1268–1273.
253. Hernández-Martín E, Otero C (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technol* 99:277–286.
254. Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z (2006) Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B-Enzym* 43:58–62.
255. Huang Y, Zheng H, Yan Y (2010) Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Appl Biochem Biotech* 160:504–515.
256. Xu Y, Nordblad M, Woodley JM (2012) A two-stage enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor. *J Biotechnol* 162:407–414.



257. Rodrigues RC, Ayub M a. Z (2011) Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochem* 46:682–688.
258. Nie K, Xie F, Wang F, Tan T (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B-Enzym* 43:142–147.
259. Gandhi NN, Mukherjee KD (2000) Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates. *J Agr Food Chem* 48:566–70.
260. Šinkūnienė D, Kiriliauskaitė V, Bendikienė V, Juodka B (2008) Properties and Immobilization of *Enterobacter aerogenes* 13 Lipase. *Rom Biotech Lett* 13:74–84.
261. Lide DR (2004) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th Edition, 2003-2004. *Handbook of Chemistry and Physics*
262. Goldberg M, Thomas D, Legoy MD (1990) The control of lipase-catalysed transesterification and esterification reaction rates. Effects of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. *Eur J Biochem* 190:603–9.
263. Mahapatra P, Kumari A, Kumar Garlapati V, Banerjee R, Nag A (2009) Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology. *J Mol Catal B-Enzym* 60:57–63.
264. Krishna SH, Manohar B, Divakar S, Karanth NG (1999) Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: optimization by response surface methodology. *J Am Oil Chem Soc* 76:1483–1488.
265. Rodriguez-Nogales JM, Roura E, Contreras E (2005) Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. *Process Biochem* 40:63–68.
266. Aragão VC, Porto MRA, Burkert CAV, Kalil SJ, Burkert JF de M (2011) Response surface methodology approach for the synthesis of ethyl butyrate. *Food Technol Biotech* 49:103–110.
267. Kuo C, Chiang S, Ju H, Chen Y, Liao M, Liu Y, Shieh C (2012) Enzymatic synthesis of rose aromatic ester (2- phenylethyl acetate) by lipase. *J Sci Food Agric* 92:2141–2147.
268. Hari Krishna S, Karanth NG (2001) Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study. *BBA-Protein Struct M* 1547:262–267.
269. Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 30:81–87.
270. Kim J, Altreuter DH, Clark DS, Dordick JS (1998) Rapid synthesis of fatty acid esters for use as potential food flavors. *J Am Oil Chem Soc* 75:1109–1113.

## PRIEDAI

P.1 lentelė. Eksperimento planas ir nepriklausomų kintamųjų įtaka TO ir OR koncentracijoms. ER - eksperimento rezultatai, MR - modeliavimo rezultatai. Normuotos nepriklausomų kintamųjų vertės pateiktos skliaustuose.

Standartinė seka	vykdymo seka	Veiksny A: trukmė, min	Veiksny B: temperatūra, °C	Veiksny C: fementas	Atsakas 1, TO koncentracija, %		Atsakas 2, OR koncentracija, %	
					ER	MR	ER	MR
1	13	20 (-1)	30.0 (-1)	P (1 0 0)	65.00	71.41	19.00	21.14
2	6	180 (1)	30.0 (-1)	P (1 0 0)	61.00	62.62	41.00	45.37
3	42	20 (-1)	60.0 (1)	P (1 0 0)	53.00	55.50	18.00	21.09
4	41	180 (1)	60.0 (1)	P (1 0 0)	43.00	52.60	43.00	44.62
5	33	5 (-1.188)	45.0 (0)	P (1 0 0)	80.00	64.79	12.00	16.32
6	4	195 (1.188)	45.0 (0)	P (1 0 0)	75.00	57.85	41.00	44.68
7	12	100 (0)	27.2(-0.189)	P (1 0 0)	57.00	62.03	42.00	36.74
8	31	100 (0)	62.8 (1.189)	P (1 0 0)	45.00	46.61	40.00	36.26
9	52	100 (0)	45.0 (0)	P (1 0 0)	33.00	51.32	27.00	34.56
10	37	100 (0)	45.0 (0)	P (1 0 0)	48.00	51.32	43.00	34.56
11	34	100 (0)	45.0 (0)	P (1 0 0)	57.00	51.32	39.00	34.56
12	22	100 (0)	45.0 (0)	P (1 0 0)	62.00	51.32	41.00	34.56
13	51	100 (0)	45.0 (0)	P (1 0 0)	51.00	51.32	33.00	34.56
14	15	20 (-1)	30.0 (-1)	L (0 1 0)	88.00	79.81	16.00	14.66
15	25	180 (1)	30.0 (-1)	L (0 1 0)	69.00	75.07	26.00	28.17
16	8	20 (-1)	60.0 (1)	L (0 1 0)	83.00	83.97	0.00	-1.70
17	27	180 (1)	60.0 (1)	L (0 1 0)	84.00	85.12	<del>0.00</del>	11.13
18	46	5 (-1.188)	45.0 (0)	L (0 1 0)	76.00	82.84	1.00	2.70
19	14	195 (1.188)	45.0 (0)	L (0 1 0)	86.00	80.71	21.00	18.32
20	5	100 (0)	27.2(-1.189)	L (0 1 0)	79.00	70.56	22.00	26.44
21	48	100 (0)	62.8 (1.189)	L (0 1 0)	91.00	79.01	0.00	6.57
22	11	100 (0)	45.0 (0)	L (0 1 0)	75.00	71.78	16.00	14.57
23	47	100 (0)	45.0 (0)	L (0 1 0)	68.00	71.78	14.00	14.57
24	44	100 (0)	45.0 (0)	L (0 1 0)	68.00	71.78	17.00	14.57
25	1	100 (0)	45.0 (0)	L (0 1 0)	79.00	71.78	19.00	14.57
26	38	100 (0)	45.0 (0)	L (0 1 0)	50.00	71.78	16.00	14.57
27	20	20 (-1)	30.0 (-1)	LF (0 0 1)	96.00	92.66	0.00	-0.069
28	3	180 (1)	30.0 (-1)	LF (0 0 1)	90.00	87.60	7.00	2.63
29	18	20 (-1)	60.0 (1)	LF (0 0 1)	95.00	94.36	0.00	-2.17
30	2	180 (1)	60.0 (1)	LF (0 0 1)	95.00	95.20	1.00	-0.18
31	49	5 (-1.188)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	90.00	94.49	0.00	-3.89
32	10	195 (1.188)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	89.00	91.99	0.00	-1.11
33	28	100 (0)	27.2(-1.189)	LF (0 0 1)	79.00	83.48	2.00	4.96
34	26	100 (0)	62.8 (1.189)	LF (0 0 1)	89.00	89.01	0.00	2.04
35	9	100 (0)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	98.00	83.24	0.00	1.56
36	35	100 (0)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	77.00	83.24	0.00	1.56
37	7	100 (0)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	96.00	83.24	0.00	1.56
38	50	100 (0)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	90.00	83.24	0.00	1.56
39	39	100 (0)	45.0 (0)	LF (0 0 1)	61.00	83.24	0.00	1.56

40	19	20 (-1.0)	30.0 (-1)	L50 (-1 -1 -	70.00	75.99	17.00	11.22
41	24	180 (1.0)	30.0 (-1)	L50 (-1 -1 -	60.00	61.61	28.00	23.67
42	36	20 (-1.0)	60.0 (1)	L50 (-1 -1 -	<del>79.00</del>	82.37	<del>21.00</del>	4.94
43	16	180 (1.0)	60.0 (1)	L50 (-1 -1 -	76.00	73.93	15.00	16.67
44	21	5 (-1.188)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	79.00	81.06	2.00	4.39
45	43	195 (1.188)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	60.00	67.49	19.00	18.76
46	17	100 (0)	27.2(-1.189)	L50 (-1 -1 -	68.00	61.71	18.00	21.52
47	32	100 (0)	62.8 (1.189)	L50 (-1 -1 -	71.00	72.84	20.00	13.62
48	29	100 (0)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	64.00	64.27	14.00	15.63
49	40	100 (0)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	58.00	64.27	16.00	15.63
50	23	100 (0)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	75.00	64.27	14.00	15.63
51	45	100 (0)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	68.00	64.27	13.00	15.63
52	30	100 (0)	45.0 (0)	L50 (-1 -1 -	67.00	64.27	12.00	15.63

P – Palatase, L – Lecitase, LF – Lipopan F BG, L50 – Lipopan 50 BG

P.2 lentelė. TO hidrolizės TO koncentracijos kvadratinio modelio ANOVA (II dalis)

Rodiklis	Vertė	Rodiklis	Vertė
Standartinis nuokrypis	9,86	R <sup>2</sup>	0,7155
Vidurkis	72,29	Koreguotas R <sup>2</sup>	0,6049
Variacijos	13,64	Prognozuotas R <sup>2</sup>	0,4969
Prognozuojama liktinė kvadratų suma	6187,66	Atitinkamas tikslumas	9,089

P.3 lentelė. TO hidrolizės OR koncentracijos kvadratinio modelio ANOVA (II dalis)

Rodiklis	Vertė	Rodiklis	Vertė
Standartinis nuokrypis	4,21	R <sup>2</sup>	0,9376
Vidurkis	16,10	Koreguotas R <sup>2</sup>	0,9126
Variacijos	26,14	Prognozuotas R <sup>2</sup>	0,8526
Prognozuojama liktinė kvadratų suma	1463,39	Atitinkamas tikslumas	21,368

P.4 lentelė. Modelinių lygčių koeficientai, išreikšti normuotomis vertėmis

Atsakas	Laisvasis narys	A	B	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	AB	AC <sub>1</sub>	AC <sub>2</sub>	AC <sub>3</sub>	BC <sub>1</sub>	BC <sub>2</sub>	BC <sub>3</sub>	A <sup>2</sup>	B <sup>2</sup>
Y <sub>1</sub>	67,65	-2,65	1,02	-16,34	4,13	15,59	1,47	-0,28	1,75	1,59	-7,5	2,53	1,31	7,09	2,12
Y <sub>2</sub>	16,58	6,44	-3,28	17,98	-2,01	-15,02	-0,18	5,51	0,14	-5,26	3,08	-5,08	2,05	-2,88	1,37

Y<sub>1</sub> ir Y<sub>2</sub> yra atsako vertės (atitinkamai TO ir OR koncentracijos), A - trukmė, B – temperatūra, C - fermentas.

P.5 lentelė. TO hidrolizės reakcijos optimizavimo kriterijai

Apribojimai	Tikslas	Apatinė riba	Viršutinė riba	Apatinės intervalo dalies įtaka	Viršutinės intervalo dalies įtaka	Svarba
Veiksny						
A: trukmė, min	Minimizuoti	20	180	1	0,1	2
B: temperatūra, °C	Minimizuoti	30	60	1	0,1	2
C: fermentas	Visa seka	Palatase	Lipopan 50 BG	1	1	3
TO koncentracija	Minimizuoti	33	98	1	1	3
OR koncentracija	Maksimizuoti	0	43	1	1	3

P.6 lentelė. Optimizavimo kriterijai TO peresterinimo metanoliu reakcijai

Apribojimai	Tikslas	Apatinė riba	Viršutinė riba	Apatinės intervalo dalies įtaka	Viršutinės intervalo dalies įtaka	Svarba
Veiksny						
A: trukmė, min.	Minimizuoti	20	180	1	0,1	1
B: temperatūra, °C	Minimizuoti	30	60	1	0,1	1
TO koncentracija	Minimizuoti	46,82	95,45	1	1	2
MeO koncentracija	Maksimizuoti	0,34	24,74	1	1	5

P.7 lentelė. APM eksperimento planas, taikytas biodyzelino sintezės iš LSA ir KT mišinio naudojant Lipolase L (EX), Resinase A2X, Lipozyme RM IM tyrimams

Eilės nr.	Temperatūra, °C	Trukmė, val.	Lipazės koncentracija, %	Alkoholio:riebalų molinis santykis
1	30	1	10	6
2	60	1	3	6
3	60	8	3	6
4	30	1	3	4
5	30	8	6,5	4
6	60	8	10	4
7	60	1	10	4
8	30	8	3	5
9	30	4,5	10	4
10	30	4,5	3	6
11	30	8	10	6
12	45	1	6,5	5
13	45	8	3	4
14	60	4,5	3	4
15	60	4,5	10	6
16	45	6,25	6,5	5
17	30	4,5	6,5	5
18	60	4,5	6,5	5
19	45	4,5	3	5
20	45	4,5	10	5
21	60	8	10	4
22	60	8	3	6
23	30	8	10	6
24	30	1	3	4
25	30	1	10	6

P.8 lentelė. Atsako paviršiaus kvadratinio modelio ANOVA (I dalis)

Šaltinis	Kvadratų	Laisvės	Vidutinis	F	p-vertė	
Modelis	4718.05	8	589.76	40.89	< 0.0001	reikšmingas
<i>A-Fermento</i>	2164.95	1	2164.95	150.09	< 0.0001	
<i>B-Substratų</i>	1788.02	1	1788.02	123.96	< 0.0001	
<i>C-</i>	45.15	1	45.15	3.13	0.0914	
<i>D-Trukmė</i>	297.53	1	297.53	20.63	0.0002	
<i>AB</i>	48.51	1	48.51	3.36	0.0809	
<i>BC</i>	40.25	1	40.25	2.79	0.1097	
<i>A<sup>2</sup></i>	292.03	1	292.03	20.25	0.0002	
<i>B<sup>2</sup></i>	144.09	1	144.09	9.99	0.0047	
Liekamoji	302.90	21	14.42			
<i>Neatitikimas</i>	281.89	16	17.62	4.19	0.0604	nereikšmingas
<i>Teorinė</i>	21.01	5	4.20			
Bendra	5020.95	29				

P.9 lentelė. Atsako paviršiaus kvadratinio modelio ANOVA (II dalis)

Standartinis nuokrypis	3.80	R <sup>2</sup>	0.9397
Vidurkis	54.97	Koreguotas R <sup>2</sup>	0.9167
Variacijos koef. %	6.91	Prognozuotas R <sup>2</sup>	0.8497
Prognozuojama liktinė	754.57	Atitinkamas tikslumas	26.118