

Univerzitet u Beogradu  
Tehnološko-metalurški fakultet

Sonja M. Jakovetić Tanasković

**ENZIMSKA PROIZVODNJA ESTARA  
FENOLNIH KISELINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

University of Belgrade

Faculty of Technology and Metallurgy

Sonja M. Jakovetić Tanasković

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF PHENOLIC  
ACID ESTERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**Mentor:**

.....  
Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**Članovi komisije:**

.....  
Dr Dejan Bezbradica, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
Dr Nevenka Bošković-Vragolović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
Dr Mirjana Antov, redovni profesor  
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

Datum odbrane: .....

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija izvedena je na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i Biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata urađen je na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Zorici Knežević-Jugović koja je imala bezgranično strpljenje i podršku tokom izrade ove doktorske disertacije. Neizmerno sam zahvalna na prenetom znanju i ukazanom poverenju.*

*Naročito sam zahvalna van. prof. dr Dejanu Bezbradici na aktivnom učestvovanju u svim fazama eksperimentalnog rada, analizi i obradi rezultata.*

*Iskreno zahvaljujem prof. dr Nevenki Bošković-Vragolović na pomoći u osmišljavanju i realizovanju eksperimentalnog rada u protočnim sistemima.*

*Zahvaljujem se i prof. dr Mirjani Antov na ukazanom vremenu i poverenju.*

*Iskreno zahvaljujem i kolegama sa Hemijskog fakulteta, naročito dr Nenadu Milosaviću na srdačnom dočeku i ukazanoj pomoći u toku eksperimentalnog rada.*

*Najtoplije zahvaljujem profesorima, kolegama doktorandima i tehničkom osoblju Katedre za Biohemijsko inženjerstvo i Biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi i iskenoj podršci i savetima. Narčitu zahvalnost dugujem kolegama i prijateljima: dr Milici Carević, dr Neveni Luković, dr Mariji Ćorović i Mladenu, koji su uvek bili tu da mi pomognu i pruže podršku u svakoj fazi izrade ove disertacije. Zahvalila bih i kolegamicama Jeleni i Andrei na ukaznoj pomoći u eksperimentalnom radu.*

*Bezgraničnu zahvalnost na podršci, strpljenju i razumevanju dugujem svojim najbližima, mami Mirjani, ocu Milisavu, bratu Dušanu, suprugu Vladimiru i prijateljima, a najviše sinu Urošu, koji me je motivisao da ovu disertaciju privedem kraju.*

## Enzimska proizvodnja estara fenolnih kiselina

### IZVOD

Fenolne kiseline su sekundarni metaboliti biljaka i kao takve čine deo svakodnevne čovekove ishrane. Poznato je da ova jedinjenja poseduju niz fizioloških svojstava koja ih čine atraktivnim u naučnom svetu, među kojima je antioksidativna aktivnost najbolje ispitana. Ovi prirodni antioksidansi još više dobijaju na značaju zbog indikacija da razgradnjom komercijalnih sintetskih antioksidanasa nastaju kancerogena jedinjenja. Međutim, zbog hidrofilne prirode njihova efikasnost u nepolarnim sredinama je ograničena, a lipofilizacija esterifikacijom je jedan od načina da se ovaj problem prevaziđe. Enzimska sinteza fenolnih estara predstavlja ekološki prihvatljiv način sinteze estara, a sami proizvodi dobijeni na ovaj način spadaju u zelene proizvode, što je od izuzetnog značaja kod proizvodnje namirnica namenjenih za ljudsku upotrebu. Kako bi enzimska sinteza estara bila konkurentna hemijskoj, odnosno kako bi se sintetisale velike količine estara uz male utroške enzima, neophodno je izvršiti optimizaciju ključnih reakcionih parametara (koncentracije enzima i supstrata, temperature, intenziteta mešanja i reakcionog vremena), što je bio i cilj ove disertacije. Pre svega pristupilo se pronalaženju adekvatnog biokatalizatora, koji bi sintetisao fenolne estre u visokom prinosu. Ispitani su komercijalni imobilisani preparati lipaze B iz *Candida antarctica* i lipaze iz *Rhizomucor miehei*, Novozyme 435 i Lipozyme RM IM, redom, kao i nekoliko lipaza izolovanih i prečišćenih na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Od ispitanih enzima, Novozyme 435 se pokazao kao superioran u sintezi svih sintetisanih estara. U nastavku je pokazano da specifičnost ovog preparata zavisi od strukture fenolne kiseline i da najveći afinitet pokazuje prema fenolnim kiselinama sa zasićenim bočnim nizom, *p*-hidroksifenilpropionskom i dihidrokafenom kiselinom. Dvostruka veza konjugovana sa aromatičnim prstenom kod cimetne kiseline, dovela je do blagog pada prinosa reakcije, dok je uvođenje elektron donorskih grupa u *para* položaj prouzrokovalo drastičan pad u ostvarenim prinosima. Utvrđeno je da je elektronski efekat inhibicije dominantan u odnosu na sterni. S druge strane pokazano je da afinitet Novozyme 435 prema različitim alifatičnim acil akceptorima zavisi od strukture acil donora, i da generalno s porastom broja C atoma acil akceptora prinos reakcije opada, a isto važi i za antioksidativnu aktivnost sintetisanih estara. Napolarni izooktan se pokazao kao najbolji reakcioni

medijum nezavisno od sintetisanog estera. Optimizacijom procesnih parametara postignuti su visoki stepeni konverzije sintetisanih estera (etil- i oleil-cinamata i etil-ferulata) ~100%. Pored stepena konverzije proces sinteze fenolnih estera je optimizovan i sa aspekta produktivnosti kada su kao odzivi praćeni prinos proizvoda ( $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ) i specifična aktivnost esterifikacije ( $\text{IU}/\text{g}$ ) čime se omogućuje postizanje što većih koncentracija proizvoda uz minimalni utrošak enzima i vremena. Pokazano je da se optimalne vrednosti procesnih parametara dosta razlikuju za različite odzive. Kako bi se omogućilo povećanje razmera procesa, u nastavku je razvijen i optimizovan reaktorski sistem sa fluidizovanim slojem koji je uspešno implementiran u sintezi etil-cinamata korišćenoj kao model reakciji sinteze estera fenolnih kiselina. Određeni su i odgovarajući kinetički modeli sinteze etil-cinamata u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom bioreaktoru. Pokazano je da se reakcija odvija po ping-pong bi bi mehanizmu i da se u šaržnom bioreaktoru javlja inhibicija etanolom. Hidrodinamički proračun u oba bioreaktorska sistema pokazao je da je reakcija kinetički kontrolisana, odnosno da su dobijeni modeli validni. Dalje povećanje ekonomičnosti postupka sinteze fenolnih estera omogućeno je razvojem sopstvenog imobilisanog preparata lipaze B. Kao nosač za imobilizaciju korišćen je metakaolin, jeftin i veoma dostupan materijal. Nakon optimizovanja procesa imobilizacije (pH i jonske jačine rastvora za imobilizaciju, koncentracije enzima i vremena imobilizacije), pokazalo se da je  $10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$  acetatni pufer pH 5 optimalan za adsorpciju lipaze B na metakaolin. Dobijeni imobilizat je uspešno implementiran u sintezi estera fenolnih kiselina, pri čemu je sa *p*-hidroksifenilpropionskom kiselinom dobijen stepen konverzije od gotovo 100% pri koncentraciji enzima od  $8 \text{ mg}/\text{cm}^3$ .

**Ključne reči:** fenolna kiselina, lipaza B, imobilizacija, reakcija esterifikacije, antioksidansi, bioreaktor sa fluidizovanim slojem

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK broj:** 577.15:547.562

## Enzymatic synthesis of phenolic acid esters

### ABSTRACT

As secondary plant metabolites phenolic acids are common components of daily human diet. It is well established that these compounds have several physiological activities, amongst which the antioxidant activity is the most studied one. Indications that degradation of commercial synthetic antioxidants leads to formation of toxic and carcinogenic compounds have made phenolic compounds even more attractive. Nevertheless, their hydrophilic nature limits their efficiency in non polar environments. One of the ways to overcome this obstacle is lipophilization of these compounds *via* esterification. Enzymatic synthesis seems to be eco-friendly way of producing lipophilic phenols, and the products obtained on this way are considered as green which is of utter importance for the products intended for human consumption. For enzymatic synthesis to prevail over the chemical synthesis, the process has to be efficient i.e. high ester yields should be produced using minimal amounts of enzyme. In order to achieve this it is necessary to optimize key process parameters (enzyme and substrate concentrations, temperature, mixing intensity and reaction time), that was set as the main goal of this thesis. The first aim was to find adequate biocatalyst which would synthesize phenolic esters with high yields. Commercial immobilized preparations of lipase B from *Candida antarctica* and lipase from *Rhizomucor miehei*, Novozyme 435 and Lipozyme RM IM, respectively, were tested along with several lipases isolated at the Department of Biochemical Engineering and Biotechnology, University of Belgrade. Amongst all tested enzymes, Novozyme 435 was proved as the superior biocatalyst for all synthesized esters. Further, it was shown that specificity of Novozyme 435 towards phenolic acids was highly dependent upon their structure. The highest conversions were achieved with *p*-hydroxyphenyl propionic and dihydrocaffeic acids, which both have saturated side chain. Double bond conjugated with aromatic ring of cinnamic acid caused slight decline in achieved conversions. Further, the introduction of electron donating groups in para position led to serious decline in achieved conversions. It was concluded that this inhibition was consequence of both electron and steric effects, with electron effect being the dominant one. On the other hand, the affinity of Novozyme 435 towards alcohols depended on the structure of acyl donor, but it can be concluded that an increase in alcohol chain length caused decline in conversion yields. The same trend was noticed for the

antioxidant activity of synthesized esters. Non polar isooctane was proved to be the adequate reaction medium for all synthesized esters. Optimization of process parameters resulted in high conversions within the esterification reactions. Process optimization was also conducted with the respect of process productivity, when product yield and specific esterification activity were used as the process outputs, which enabled high ester yields with minimal enzyme and time consumption. In order to assay large scale enzymatic synthesis of phenolic esters, a bioreactor with fluidized bed was designed and operating conditions were optimized using ethyl cinnamate synthesis as a model reaction. For the same purpose kinetic models of the ethyl cinnamate synthesis were obtained in both fluidized bed and batch bioreactor, and it was shown that the reaction followed ping pong bi bi mechanism, where inhibition with the excess of alcohol occurred only in the batch bioreactor. Hydrodynamic calculations showed that the reaction occurred without any mass transfer limitations. Further improvement of process efficiency was achieved with the development of new immobilized lipase preparation. Metakaolin, cheap and easily obtainable material, was used as the immobilization carrier. It was shown that immobilized preparation obtained under optimized conditions could be adequate alternative for Novozyme 435 in the synthesis of some phenolic esters. The highest conversions of approximately 100% were achieved with *p*-hydroxyphenyl propionic acid with enzyme concentration of 8 mg/cm<sup>3</sup>.

**Keywords:** phenolic acid, lipase B, immobilization, esterification , antioxidants, fluidized bed bioreactor

**Academic Expertise:** Engineering technology

**Major in:** Biochemical Engineering and Biotechnology

**UDC number:** 577.15:547.562



# Sadržaj:

<b>SADRŽAJ:</b> .....	<b>5</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 TEORIJSKI DEO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDANSI</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 FENOLNA JEDINJENJA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 LIPAZE</b> .....	<b>11</b>
2.3.1 STRUKTURA, KLASIFIKACIJA I MEHANIZAM DELOVANJA LIPAZA .....	13
2.3.2 LIPAZA IZ <i>C. ANTARCTICA</i> IZOFORMA B .....	18
2.3.3 LIPAZA IZ <i>R. MIEHEI</i> .....	24
2.3.4 UPOTREBA LIPAZA.....	25
2.3.4.1 Upotreba lipaza u detergentima.....	26
2.3.4.2 Upotreba lipaze u farmaceutskoj industriji .....	27
2.3.4.3 Primena lipaze u prehrambenoj industriji .....	28
2.3.4.4 Upotreba lipaze u sintezi biodizela .....	31
2.3.4.5 Upotreba lipaze u kozmetičkoj industriji .....	31
<b>2.4 SINTEZA ESTARA</b> .....	<b>34</b>
2.4.1 SINTEZA ESTARA FENOLNIH KISELINA .....	35
2.4.1.1 Izbor enzima .....	35
2.4.1.2 Uticaj vrste acil donora na sintezu fenolnih estara.....	40
2.4.1.3 Uticaj vrste acil akceptora .....	43
2.4.1.4 Uticaj molskog odnosa supstrata.....	44
2.4.1.5 Uticaj temperature .....	46
2.4.1.6 Izbor reakcionog medijuma.....	47
2.4.1.7 Uticaj vode na sintezu estara fenolnih kiselina .....	49
2.4.2 KINETIKA SINTEZE ESTARA FENOLNIH KISELINA .....	50
<b>2.5 KONFIGURACIJA PROTOČNIH REAKTORA PRIMENJENIH U ENZIMSKOJ SINTEZI ESTARA FENOLNIH KISELINA</b> .....	<b>55</b>
<b>2.6 IMOBILIZACIJA ENZIMA I NJIHOVA PRIMENA U SINTEZI ESTARA FENOLNIH KISELINA</b>	<b>63</b>
2.6.1 ADSORPCIJA ENZIMA .....	67
2.6.1.1 Primena imobilisanih enzima u sintezi estara fenolnih kiselina.....	68
<b>3 EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>71</b>
<b>3.1 MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>71</b>
3.1.1 MATERIJALI .....	71
3.1.2 INSTRUMENTI .....	73
3.1.3 METODE .....	74
3.1.3.1 Enzimska sinteza estara fenolnih kiselina u šaržnom reaktoru .....	74

3.1.3.2	Optimizacija sinteze estara cimetine kiseline.....	74
3.1.3.2.1	Odabir acil akceptora .....	74
3.1.3.2.2	Odabir reakcionog medijuma .....	74
3.1.3.2.3	Odabir brzine mešanja.....	75
3.1.3.2.4	Odabir molskog odnosa supstrata .....	75
3.1.3.2.5	Odabir reakcione temperature .....	75
3.1.3.2.6	Sinteza oleil-cinamata alkoholizom etil-cinamata .....	75
3.1.3.3	Enzimaska sinteza etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem .....	75
3.1.3.4	Ispitivanje početne kinetike sinteze etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom reaktoru .....	77
3.1.3.5	Enzimaska sinteza estara fenolnih kiselina u šaržnom reaktoru sa lipazom imobilisanom na metakaolin .....	77
3.1.3.6	Određivanje prinosa estara volumetrijskim određivanjem sadržaja neproreagovale fenolne kiseline .....	77
3.1.3.7	Određivanje prinosa estara RP-HPLC metodom .....	78
3.1.3.8	Imobilizacija lipaze B iz <i>C.antarctica</i> na kaolin.....	78
3.1.3.9	Određivanje aktivnosti slobodne i imobilisane lipaze.....	79
3.1.3.10	Karakterizacija nosača i imobilisanog enzima .....	79
3.1.3.10.1	Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR).....	79
3.1.3.10.2	Difrakcija X zracima .....	80
3.1.3.10.3	Skenirajuća elektronska mikroskopija .....	80
3.1.3.10.4	Određivanje raspodele veličina čestica i zeta potencijala .....	80
3.1.3.11	Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradfordu [150].....	81
3.1.3.12	Određivanje antioksidativne aktivnosti sintetisanih estara pomoću DPPH metode... 81	
3.1.3.13	Određivanje antioksidativnih osobina estara metodom ciklične voltometrije.....	83
3.1.3.14	Određivanje antikoagulacionih osobina estara fenolnih kiselina .....	83

## **4 REZULTATI I DISKUSIJA ..... 84**

### **4.1 UTICAJ VRSTE BOKATALIZATORA I PRIRODE ACIL DONORA NA PRINOS REAKCIJE ESTERIFIKACIJE ..... 84**

#### **4.1.1 IZBOR ODGOVARAJUĆEG ENZIMSKOG PREPARATA ZA SINTEZU ESTARA FENOLNIH KISELINA..... 84**

#### **4.1.2 ODREĐIVANJE SPECIFIČNOSTI CALB I RLM PREMA ACIL DONORIMA SA RAZLIČITIM SUPSTITUENTIMA NA AROMATIČNOM PRSTENU ..... 88**

### **4.2 OPTIMIZACIJA ENZIMSKE SINTEZE ESTARA CIMETNE KISELINE ..... 92**

#### **4.2.1 UTICAJ VRSTE ACIL AKCEPTORA NA STEPEN KONVERZIJE CIMETNE KISELINE ..... 93**

##### **4.2.1.1 Antioksidativne osobine estara cimetine kiseline..... 95**

##### **4.2.1.2 Antikoagulaciona aktivnost etil-cinamata..... 96**

#### **4.2.2 UTICAJ REAKCIONOG MEDIJUMA NA STEPEN KONVERZIJE CIMETNE KISELINE..... 97**

#### **4.2.3 UTICAJ BRZINE MEŠANJA NA STEPEN KONVERZIJE CIMETNE KISELINE..... 99**

#### **4.2.4 UTICAJ KONCENTRACIJE ENZIMA NA STEPEN KONVERZIJE CIMETNE KISELINE ..... 100**

#### **4.2.5 UTICAJ MOLSKOG ODNOSA NA STEPEN KONVERZIJE CIMETNE KISELINE..... 102**

#### **4.2.6 UTICAJ TEMPERATURE NA SINTEZU ESTARA CIMETNE KISELINE ..... 106**

#### **4.2.7 OPTIMIZACIJA SINTEZE OLEIL-CINAMATA ..... 107**

##### **4.2.7.1 Uticaj temperature..... 114**

##### **4.2.7.2 Uticaj koncentracije supstrata ..... 117**

4.2.7.3	Uticaj mase enzima .....	120
4.2.7.4	Uticaj reakcionog vremena .....	121
4.2.7.5	Sinteza oleil-cinamata transesterifikacijom etil-cinamata.....	122
<b>4.3</b>	<b>SINTEZA ETIL-CINAMATA U REAKTORU SA FLUIDIZOVANIM SLOJEM, KINETIČKA STUDIJA I PRENOS MASE .....</b>	<b>123</b>
4.3.1.1	Optimizacija sinteze etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem.....	124
4.3.1.2	Uticaj vremena zadržavanja sintezu etil-cinamata .....	129
4.3.1.3	Kinetička studija i proračun prenosa mase.....	130
<b>4.4</b>	<b>OPTIMIZACIJA ENZIMSKE SINTEZA ESTARA FERULNE KISELINE .....</b>	<b>139</b>
4.4.1	UTICAJ ACIL AKCEPTORA NA STEPEN KONVERZIJE FERULNE KISELINE .....	139
4.4.2	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FERULNIH ESTARA.....	143
4.4.3	UTICAJ REAKCIONIH PARAMETARA NA STEPEN KONVERZIJE ETIL-FERULATA .....	147
4.4.3.1	Uticaj koncentracije ferulne kiseline.....	148
4.4.3.2	Uticaj molskog odnosa.....	150
4.4.3.3	Uticaj mase enzima .....	152
<b>4.5</b>	<b>IMOBILIZACIJA LIPAZE B IZ <i>C.ANTARCTICA</i> NA METAKAOLIN I PRIMENA DOBIJENIH IMOBILIZATA U SINTEZI ESTARA FENOLNIH KISELINA.....</b>	<b>155</b>
4.5.1	KARAKTERIZACIJA NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU I BOKATALIZATORA .....	155
4.5.1.1	FT-IR spektri.....	157
4.5.1.2	Analiza difraktograma kaolina i termički tretiranog kaolina .....	158
4.5.1.3	SEM .....	159
4.5.2	IMOBILIZACIJA CALB NA METAKAOLIN .....	160
4.5.2.1	Uticaj pH na adsorpciju CALB na metakaolin.....	160
4.5.2.2	Uticaj jonske jačine na adsorpciju CALB na metakaolin.....	162
4.5.2.3	Kinetika adsorpcije CALB na metakaolin .....	163
4.5.2.4	Adsorpciona izoterma .....	164
4.5.2.5	Sinteza estara fenolnih kiselina sa CALB imobilisanom na metakaolin.....	165
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČAK.....</b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>170</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA .....</b>	<b>186</b>

# 1 Uvod

Interes za razvojem enzimskih procesa sinteze prirodnih antioksidanasa proizašao je iz sve veće svesti potrošača o neželjenim efektima veštačkih dodataka hrani, kao i sve strožih zakonskih mera koje regulišu njihovu primenu. Naime, dodatkom antioksidanasa hrani i kozmetičkim preparatima povećava se rok trajanja ovih proizvoda, jer se sprečava autokatalitička oksidacija mono- i polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u njihov sastav. U ove svrhe su do sada uglavnom korišćeni hemijskim putem sintetisani antioksidansi (butilhidroksianizol, butilhidroksitoluen, i *terc*-butilhidrohinon), međutim, implikacije da kao proizvodi njihove razgradnje nastaju toksične i kancerogene materije, dovele su do potrebe za pronalaskom adekvatne zamene u vidu prirodnih lipofilnih antioksidanasa. Kao moguća alternativa sintetskim antioksidansima nameću se fenolna jedinjenja koja se smatraju odgovornim za antioksidativno delovanje biljnih ekstrakata [1]. U poslednjih nekoliko godina ova jedinjenja zaokupljaju sve veću pažnju naučne javnosti, kako zbog niza fizioloških dejstava (antimikrobna, antikancerogena, antiinflamatorna, antikoagulaciona), tako i zbog pozitivnog uticaja na kvalitet proizvoda, poput boje i arome [2]. Međutim, i pored niza prednosti fenolnih jedinjenja u poređenju sa sintetičkim antioksidansima, hidrofilna priroda ih čini nepogodnim za korišćenje u uljanim formulacijama i emulzijama, ograničavajući tako njihovu upotrebu u kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. S druge strane, lipofilni estri fenolnih kiselina zadovoljavaju sve preduslove za korišćenje u takvim proizvodima. Naime, uvođenjem alifatičnog bočnog niza esterifikacijom fenolnih kiselina povećava se njihova rastvorljivost u nepolarnim sredinama, a samim tim i mogućnost njihove primene u industriji hrane, kozmetičkoj, kao i farmaceutskoj industriji. Proizvodnja estara na industrijskom nivou oslanja se na hemijsku sintezu, koja se zasniva na primeni kiselih katalizatora. U manjoj meri estri se proizvode enzimskom sintezom i ekstrakcijom iz biljaka [3]. Sinteza estara hemijskom metodom ima nekoliko značajnih nedostataka: neselektivnost reakcije koja dovodi do stvaranja velikog broja neželjenih proizvoda, toksičnost nekih sporednih proizvoda za životnu sredinu, primena koncentrovanih kiselina što komplikuje rukovanje reaktantima i dovodi do povećanih troškova za opremu zbog korozivnog dejstva. Nedostaci hemijski katalizovane sinteze mogu se prevazići korišćenjem enzimskih procesa, zahvaljujući velikoj specifičnosti i aktivnosti enzima pod

blagim procesnim uslovima. Još jedna od prednosti primene enzimskih procesa u sintezi estara je da se estri dobijeni na ovaj način svrstavaju u prirodne proizvode, a sam postupak sinteze spada u "zelene" postupke [3]. Međutim, iako je svetsko tržište enzima u 2010. godini iznosilo 5,8 milijardi \$ od čega 3,3 milijarde \$ odlazi na industrijske enzime [4] i dalje je nedovoljna primena enzima u nekim industrijskim procesima sinteze estara.

Razlog je kompleksnost enzimске sinteze estara koja zavisi od velikog broja reakcionih uslova čime je otežano optimizovanje reakcije, ali i od cene samog enzimskog preparata. Naime udeo cene enzima u ukupnim troškovima procesa zavisi od broja upotrebe enzimskog preparata i produktivnosti procesa izražene kroz kg dobijenog proizvoda i kg upotrebljenog biokatalizatora, i kreće se od svega 0,1 \$/kg do više stotina \$/kg [4]. Iz ovih podataka se vidi da enzimska sinteza može da bude konkurentna klasičnim hemijskim postupcima, ali da estar treba da bude sintetisan u velikom prinosu uz što manji utrošak skupih enzimskih preparata pod optimalnim reakcionim uslovima. Imperativ razvoja enzimске sinteze estara fenolnih kiselina nalazi se u pronalaženju jeftinijih imobilisanih biokatalizatora i razvoju kontinulanih procesa čime bi se povećala efikasnost iskorišćenja imobilisanih biokatalizatora, što je i postavljeno za cilj ove doktorske disertacije.

Kako bi se ostvario ovaj cilj, neophodno je pronaći odgovarajući biokatalizator koji će efikasno da sintetiše fenolne estre, pa će prvi zadatak ove disertacije biti pronalaženje odgovarajuće lipaze i utvrđivanje njene specifičnosti prema fenolnim kiselinama. Za izabrane fiziološki aktivne kiseline, cimetnu i ferulnu, biće ispitan i uticaj različitih acil akceptora na prinos reakcije esterifikacije, kao i antioksidativna aktivnost sintetisanih estara. U nastavku će biti analizirano nekoliko aspekata poboljšanja efikasnosti enzimski katalizovane sinteze izabranih lipofilnih antioksidanasa optimizacijom ključnih procesnih parametara (koncentracije enzima, koncentracije supstrata, temperature, izbor reakcionog medijuma), izborom reaktorskog sistema kao i razvojem novih imobilisanih preparata koji će omogućiti smanjenje cene procesa.

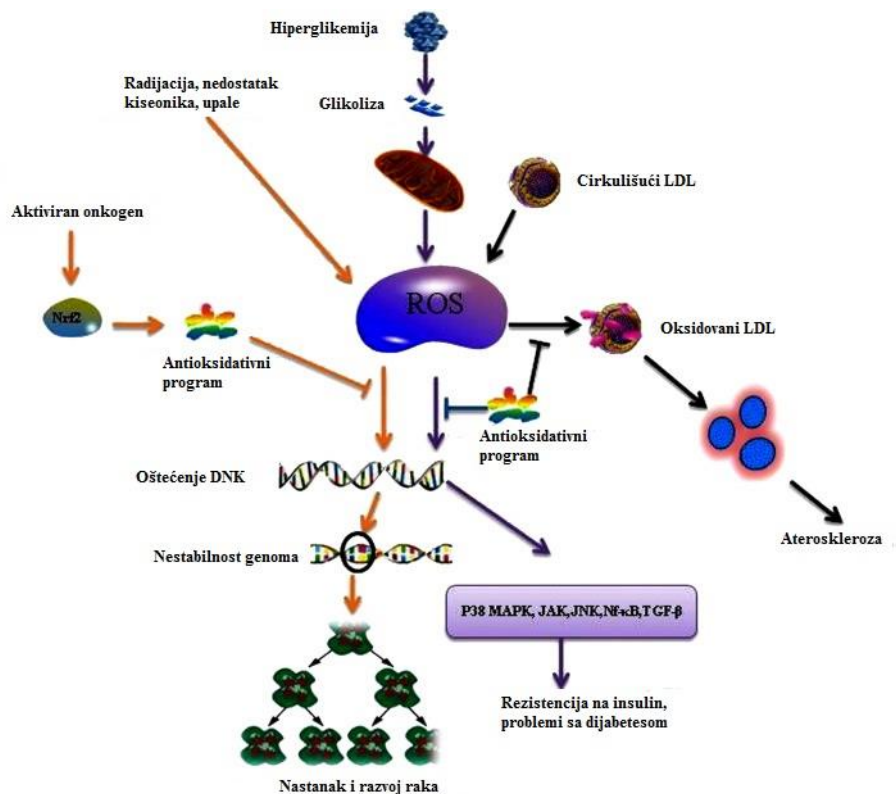
## 2 TEORIJSKI DEO

### 2.1 Slobodni radikali i antioksidansi

Slobodni radikali i oksidansi imaju dvostruku ulogu u organizmu, jer mogu istovremeno da budu i štetni i korisni za telo [5]. Naime, određena količina slobodnih radikala se u organizmu kontinualno formira kao nus-proizvod ćelijskog metabolizma i u niskim koncentracijama učestvuje u nekoliko fizioloških procesa uključujući fosforilaciju proteina, aktivaciju transkripcionog faktora, imunitet ćelija, odbranu ćelija od mikroorganizama itd. [6]. Međutim, ukoliko se u telu nađe veća koncentracija slobodnih radikala, pre svega reaktivnih vrsta kiseonika (ROS –reactive oxygen species), dolazi do njihove akumulacije i stanja koje se naziva oksidativni stres. Ovaj proces igra glavnu ulogu u razvoju velikog broja hroničnih i degenerativnih oboljenja poput raka, autoimunih poremećaja, starenja, katarakte, reumatoidnog artritisa, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti (slika 2.1) [5].

Pod pojmom slobodni radikal se smatra bilo koja vrsta koja može samostalno da postoji, a da poseduje jedan ili više nesparenih elektrona, pri čemu je nespareni elektron sam u orbitali [7]. Najvažnije slobodnoradikalske vrste koje učestvuju u oštećenju lipida, proteina i molekula DNK i time dovode do različitih oboljenja su: hidroksil radikal ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), superoksid anjon radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), azot-monoksidni radikal ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), azot-dioksidni radikal ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ), peroksil radikal ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ) i lipidni peroksil radikal ( $\text{LO}_2^{\bullet}$ ). Pored slobodnih radikala i tzv. oksidansi, odnosno oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale u organizmu mogu biti uzročnici oksidativnog stresa. U ova jedinjenja spadaju: vodonik-peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ), singletni kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ), hipohlorna kiselina ( $\text{HOCl}$ ), azotasta kiselina ( $\text{HNO}_2$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) azot(III)-oksid ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), lipid peroksid ( $\text{LOOH}$ ) [5, 8].

Nastanak slobodnih radikala i oksidansa u ćelijama odvija se putem dva mehanizma: enzimskog i neenzimskog. Enzimske reakcije tokom kojih nastaju slobodni radikali uključuju reakcije vezane za lanac disanja, fagocitozu, sintezu prostaglandina i sistem citohroma P450 [5]. Slobodni radikali koji u organizmu nastaju neenzimskim putem takođe mogu biti vezani za oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama. Formiraju se u reakcijama kiseonika i organskih jedinjenja ili jonizujućim reakcijama [5].



Slika 2.1. Antioksidansi/oksidativni stres i zdravstveni problemi koji nastaju kao posledica oksidativnog stresa [6].

Prema mestu nastanka slobodni radikali mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni slobodni radikali nastaju u organizmu i posledica su upala, mentalnog stresa, prekomernog vežbanja itd. Egzogeni slobodni radikali posledica su zagađenja vode i vazduha, dima cigareta, alkohola, radijacije itd. [5, 9].

Reaktivnost slobodnih radikala se značajno razlikuje, pa tako  $O_2^{\cdot-}$  i  $NO^{\cdot}$  mogu direktno da reaguju sa malim brojem molekula u ljudskom organizmu, dok hidroksil radikal može da reaguje sa bilo kojim biomolekulom, pa se zato smatra najreaktivnijim od svih slobodnih radikala *in vivo* [5, 7]. Kada se formira *in vivo*, ovaj radikal reaguje na mestu svog nastanka, odnosno unutar malog radijusa od mesta produkcije [7, 10]. Hidroksil radikal se u ćelijama stvara kada postoje uslovi za Haber-Vajsovu ili Fentonovu reakciju [10, 11].

Ljudski organizam se protiv oksidativnog stresa bori pomoću antioksidanasa, koji mogu da budu proizvedeni *in situ* i predstavljaju endogene antioksidanse, ili mogu da se u organizam unesu putem hrane i suplementa kao egzogeni antioksidansi. Najšire prihvaćenu definiciju bioloških antioksidanasa dao je Halliwell, prema kojoj su

antioksidansi: "supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata" [12]. Postoji više mehanizama prema kojima antioksidansi vrše svoju zaštitnu funkciju protiv slobodnih radikala, a koji uključuju: „hvatanje“ slobodnih radikala, kompleksiranje jona metala čime se sprečava njihova katalitička funkcija u procesima razgradnje lipidnih vodonik-peroksida i nastanka slobodnih radikala, razgradnju hidroperoksida lipida, sprečavanje dejstva singletnih kiseonika, inhibiciju određenih enzima, itd.

Uloga antioksidanasa je da neutrališu višak slobodnih radikala, štiteći tako ćelije od njihovih negativnih efekata i doprinoseći tako prevenciji bolesti [5]. Zahvaljujući sve većoj svesti potrošača o ulozi oksidativnog stresa u razvoju velikog broja bolesti, raste potreba za konzumiranjem hrane bogate antioksidansima, odnosno unosom egzogenih antioksidanasa. Naime, postoje indikacije da se sa unosom hrane bogate antioksidansima smanjuje rizik od dovođenja organizma u stanje oksidativnog stresa [6, 13]. Procenjeno je da prosečna čovekova ishrana sadrži 25 000 bioaktivnih jedinjenja koja mogu da utiču na stepen razvoja različitih oboljenja. Antioksidanasa najviše ima u voću i povrću, žitaricama, orašastim plodovima, mahunarkama itd. U ovom trenutku procenjeno je da se 3100 antioksidanasa nalazi u namirnicama poput sokova, začina, različitog bilja i drugih suplemenata koji se redovno konzumiraju od strane različitih kultura [13]. Jednu od najvažnijih klasa prvorodnih antioksidanasa čine fenolna jedinjenja.

## **2.2 Fenolna jedinjenja**

Fenolna jedinjenja predstavljaju heterogenu grupu sekundarnih metabolita biljaka, što ih čini široko rasprostranjenim u biljnom svetu. Funkcija fenolnih jedinjenja u biljnim organizmima nije do kraja razjašnjena, ali se zna da deluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, fotoreceptori, učestvuju u zaštiti biljnih tkiva od prekomernog UV-zračenja, a predstavljaju i deo odbrambenog mehanizma protiv patogena [14]. Ova jedinjenja čine deo svakodnevne čovekove ishrane, pošto se nalaze u bobičastom voću, jabukama, kafi, zelenom čaju, crnom vinu, začinskom bilju itd. Unos dovoljne količine fenolnih kiselina, preko namirnica biljnog porekla, ima značajnu ulogu u zaštiti organizma od štetnog oksidativnog stresa.



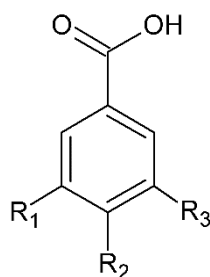
Poslednje dve decenije interesovanje za fenolnim jedinjenjima je u konstantnom porastu zahvaljujući tzv. „Francuskom paradoksu“. Naime, iako su Francuzi skloni pušenju i hrani sa visokim sadržajem masti, statistike pokazuju da znatno ređe oboljevaju od srčanih bolesti u poređenju sa dugima nacijama iz severne i zapadne Evrope, npr. Britancima i Nemicima. Najčešće korišćeno objašnjenje za postojanje ovakvog fenomena nalazi se u činjenici da Francuzi konzumiraju veće količine crnog vina, bogatog fenolnim jedinjenjima, koja ih na neki način štite od srčanih bolesti [1]. Ispitivanja su pokazala da fenolna jedinjenja poseduju niz fizioloških svojstava: antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno, antialergeno, antikancerogeno, takođe je dokazano da imaju inhibitorno dejstvo prema fosfolipazi A<sub>2</sub>, ciklooksigenazi [15-20]. Ipak, antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja tema je velikog broja naučnih radova i verovatno je najdetaljnije ispitano svojstvo ovih jedinjenja.

Pod pojmom fenolna jedinjenja podrazumeva se grupa od približno 8000 jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže barem jedan fenol (aromatičan prsten sa barem jednom hidroksilnom grupom) [1, 11]. Prema broju fenolnih jedinica dele na: polifenole, jedinjenja koja sadrže više od jednog fenola u svojoj strukturi, i fenolne kiseline, jedinjenja koja sadrže jedan fenol. Polifenoli se dalje dele na flavonoide, stilbene i tanine [1].

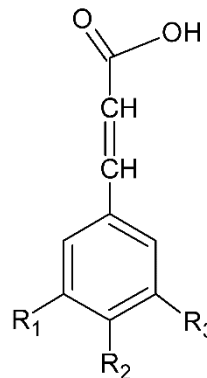
Kada se govori o fenolnim jedinjenjima u hrani uglavnom se misli na flavonoide, jer oni predstavljaju oko dve trećine ukupnih dijetetskih fenola. Međutim, fenolne kiseline čine gotovo celu preostalu trećinu, pa je interesovanje za ovom grupom jedinjenja koja pokazuju niz fizioloških svojstava u stalnom porastu. Zbog velike rasprostranjenosti u biljnom svetu, fenolne kiseline čine deo svakodnevne čovekove ishrane i procenjeno je da se dnevno unese 25 mg-1 g ovih jedinjenja zavisno od tipa ishrane (voće, povrće, čaj, kafa, začini) [21].

Pojam fenolna kiselina generalno predstavlja fenolno jedinjenje koje ima barem jednu karboksilnu funkcionalnu grupu. Međutim, kada se govori o fenolnim kiselinama kao sekundarnim metabolitima biljaka, misli se na određenu grupu organskih kiselina koje se dalje prema svojoj strukturi dele na: derivate benzoeve i derivate cimetne kiseline (Slika 2.2) [21]. Obe grupe jedinjenja sastoje se od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetne kiseline) ugljenikova atoma. Pored pomenutih kiselina u ovu grupu jednostavnih fenolnih jedinjenja spadaju i odgovarajući aldehidi. Derivati cimetne kiseline su u prirodi više rasprostranjeni, pa se

tako kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina nalaze u gotovo svim biljkama, dok se ostale fenolne kiseline vezuju za specifične biljne izvore.



a) Derivati benzoeve kiseline



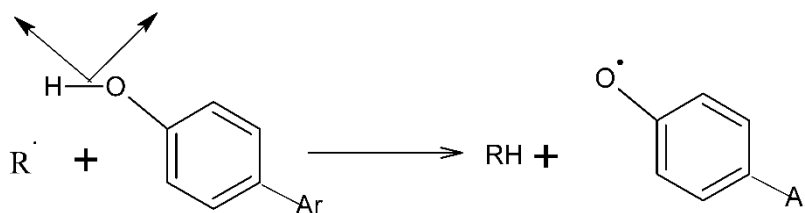
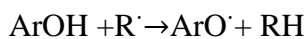
b) Derivati cimetne kiseline

Vrsta kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Vrsta kiseline	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Benzoeva kiselina	H	H	H	Cimetna kiselina	H	H	H
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H	<i>p</i> -kumarinska kiselina	H	OH	H
Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	Kafena kiselina	H	OH	OH
Vanilinska kiselina	CH <sub>3</sub>	OH	H	Ferulna kiselina	CH <sub>3</sub>	OH	H
Siringinska kiselina	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>	Sinapinska kiselina	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Galna kiselina	OH	OH	OH				

Slika 2.2. Struktura fenolnih kiseline: (a) derivati benzoeve kiseline i (b) derivati cimetne kiseline.

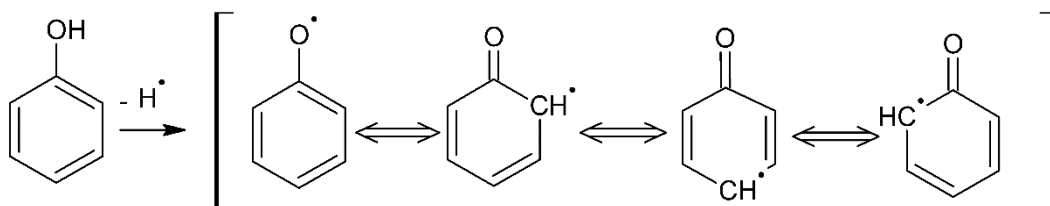
Postoje dva mehanizma kojima fenolne kiseline inaktiviraju slobodne radikale [1, 22]:

- transfer atoma vodonika (HAT- hydrogen atom transfer) (slika 2.3).



Slika 2.3. Šematski prikaz nastanka fenoksil radikala HAT mehanizmom.

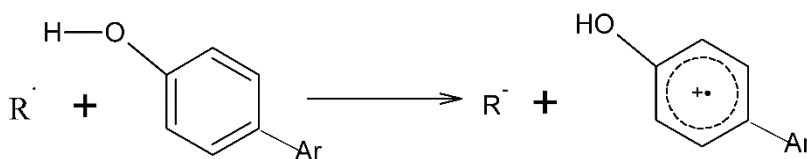
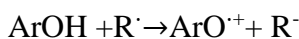
Ukoliko se inhibicija slobodnih radikala odigrava prema ovom mehanizmu, kao proizvodi nastaju bezopasni RH i oksidovani fenoksil radikal. Stabilnost nastalog fenoksil radikala direktno je povezana sa antioksidativnom efikasnošću polazne fenolne kiseline. Zapravo, što je nastali fenoksil radikal stabilniji, to je odgovarajuća fenolna kiselina bolji antioksidans. Stabilnost nastalog fenoksil radikala posledica je delokalizacije nesparenog elektrona preko tri ugljenikova atoma aromatičnog prstena, i delimično atoma kiseonika, uz postojanje više rezonantnih formi (slika 2.4) [1].



Slika 2.4. Stabilizacija fenoksil radikala

Postojanje i položaj supstituenata na prstenu utiče na stabilnost nastalog fenoksil radikala preko rezonantnog i induktivnog efekta, pa je stoga antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina u direktnoj vezi sa njihovom strukturom. Najbitniji parametar prilikom evaluacije antioksidativne aktivnosti jedinjenja predstavlja energija disocijacije O-H veze, naime s opadanjem vrednosti ove energije, dolazi do lakšeg otpuštanja vodonika, a samim tim i do porasta antioksidativne aktivnosti jedinjenja [1].

- transfer jednog elektrona (ET-electron transfer) (slika 2.5).

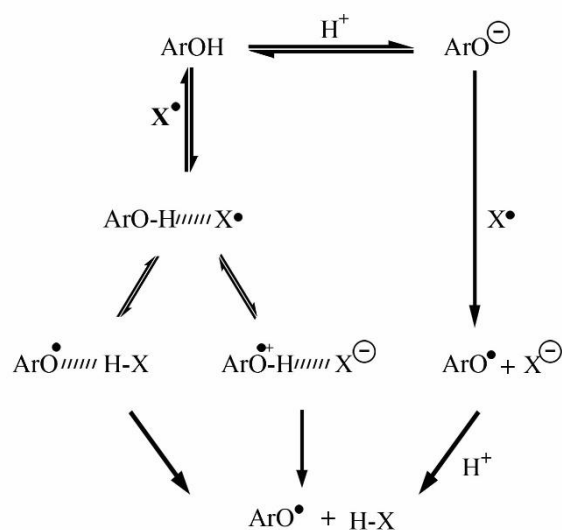


Slika 2.5. Šematski prikaz nastanka fenoksil radikala ET mehanizmom.

Prema drugom mehanizmu fenolne kiseline se ponašaju kao donori elektrona i kao proizvod nastaje pozitivno naelektrisan fenoksil radikal. Stabilnost nastalog radikala kao i u prvom mehanizmu zavisi od položaja i prirode supstituenata na prstenu. U ovom slučaju vrednost jonizacionog potencijala određuje antioksidativnu aktivnost jedinjenja [1].

Postoji još jedan antioksidativni mehanizam koji se povezuje sa fenolnim jedinjenjima, međutim on je karakterističan za polifenole i zasniva se na njihovoj sposobnosti da heliraju prelazne metale, sprečavajući ih na taj način da učestvuju u reakcijama u kojim nastaju slobodni radikali, poput Fentonove reakcije [1].

Određivanje antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina najčešće se izvodi pomoću standardne spektrofotometrijske metode inhibicije stabilnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ili DPPH<sup>•</sup> radikala. Kao što je već pomenuto inhibicija ovog radikala može da se odvija prema dva mehanizma (Slika 2.6), a koji će biti dominantan zavisi od prirode rastvarača i od redoks potencijala vrsta koje učestvuju. Većina derivata cimetine kiseline u metanolu i etanolu sa slobodnim radikalima reaguje po mehanizmu prenosa elektrona. Problem koji se javlja u literaturi je taj što fenoli sa ROO<sup>•</sup> ne reaguju po istom mehanizmu kao sa DPPH<sup>•</sup>, pa se njihova antioksidativna aktivnost ne može ekstrapolirati iz rezultata dobijenih DPPH testom [23].

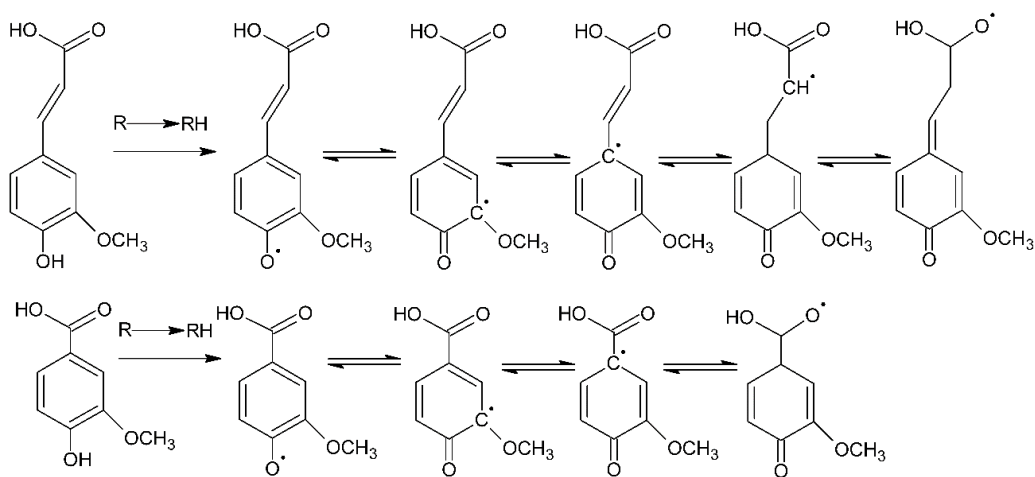


Slika 2.6. Šematski prikaz reakcije fenola i slobodnih radikala [23].

Pokazano je da polifenoli pokazuju bolja antioksidativna svojstva od odgovarajućih monofenola, kao i da uvođenje druge hidroksilne grupe u *orto* i *para* položaj značajno povećava ovu aktivnost, jer dolazi do dodatne rezonantne stabilnosti fenoksil radikala formiranjem *o*-i *p*-hinona [24]. Generalno, prisustvo elektron donorskih grupa u *orto* položaju, stabilizuje nastali fenoksil radikal [24]. Tako ferulna kiselina, koja ima metoksi grupu u *orto* položaju, ima veći antioksidativni potencijal od *p*-kumarinske kiseline, a vanilinska od *p*-hidroksibenzoeve kiseline. Takođe, uvođenje dodatne metoksi grupe u

*orto* položaju dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti, pa je sinapinska kiselina jače antioksidativno sredstvo od ferulne, a siringinska od vanilinske [25]. S druge strane, kafena kiselina koja ima hidroksilnu grupu u *orto* položaju je efikasniji antioksidans od ferulne kiseline [26, 27].

Antioksidativni kapacitet derivata cimetine kiseline veći je u odnosu na odgovarajuće derivate *p*-hidroksibenzojeve kiseline. Generalno se ovakvo ponašanje objašnjava uticajem rezonantnog efekta konjugovane dvostruke veze u bočnom lancu na povećanje stabilnosti fenoksil radikala, a time i antioksidativnih osobina ove grupe jedinjenja (slika 2.7). Derivati *p*-hidroksibenzojeve kiseline teže otpuštaju vodonikov atom iz hidroksilnih grupa i prelaze u fenoksil radikal, zbog prisustva elektronakceptorske karboksilne grupe na prstenu [28]. Neki autori se ne slažu sa prethodnom pretpostavkom, pa tako Čen ističe da je posedovanje etilenskog bočnog lanaca na prstenu, faktor koji nema bitan uticaj na antiradikalni potencijal jedinjenja [27]. Silva i saradnici publikovali su rezultate u skladu sa Čenovom teorijom. U svom radu pokazali su da dihidrokafena kiselina ima jači, a kafena kiselina slabiji antioksidativni potencijal od  $\alpha$ -tokoferola. Ovakvi rezultati upućuju na vezu između konformacije molekula fenolnih kiselina i njihove antiradikalne aktivnosti [29].



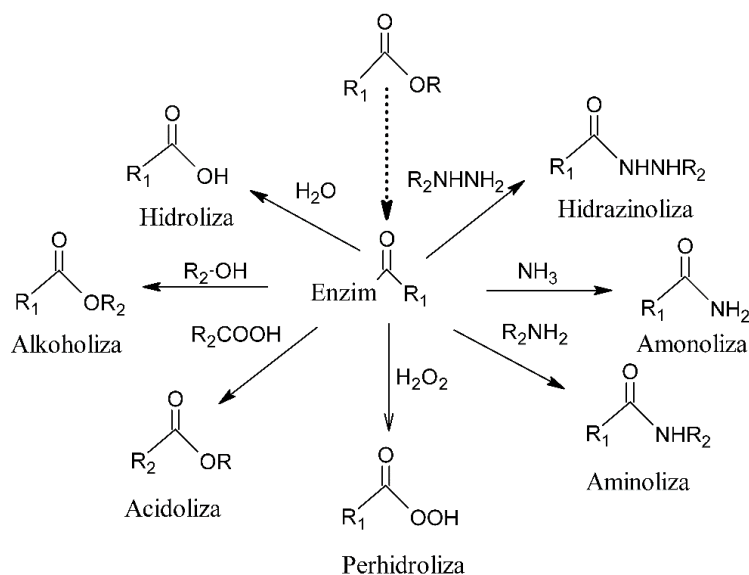
Slika 2.7. Nastajanje i formiranje mogućih rezonantnih struktura fenoksil radikala derivata cimetine i benzojeve kiseline

Treća hidroksilna grupa na prstenu značajno povećava antioksidativna svojstva fenolnih kiselina, pa je tako galna kiselina jedan od najjačih fenolnih antioksidanasa, i

često se koristi kao referentno jedinjenje prilikom određivanja antioksidativnih svojstava. Pored galne kiseline se kao referentno jedinjenje koristi i troloks, u vodi rastvoran analog vitamina E, koji je podjednako aktivan i u hidrofilnim i u lipofilnim sistemima. Pokornici i saradnici su zaključili da prisustvo više od tri hidroksilne grupe na aromatičnom jezgri ne poboljšava antioksidativnu efikasnost molekula [25].

## 2.3 Lipaze

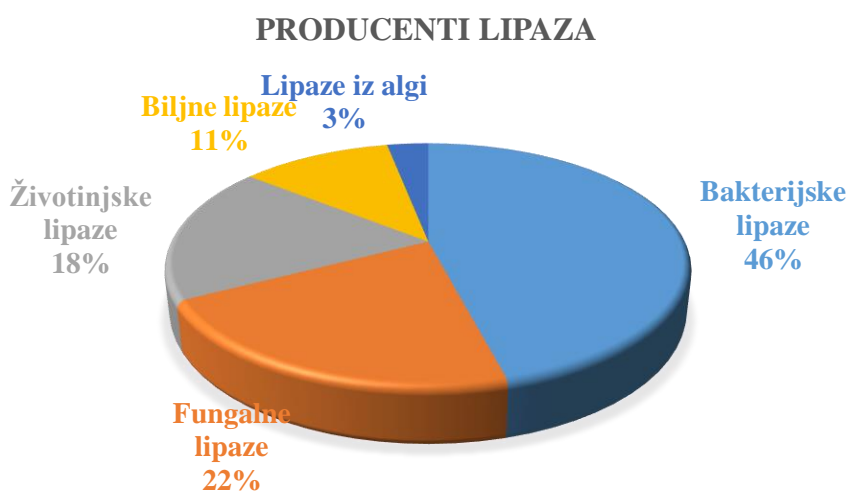
Lipaze, ili triacilglicerol-acil hidrolaze (E.C.3.1.1.3) su enzimi koji katalizuju raskidanje karboksilne veze u tri-, di- i monoacilglicerolima (glavnim konstituentima u animalnim, biljnim i mikrobnim mastima i uljima) [30]. Kao rezultat ove reakcije, oslobađaju se karboksilne kiseline i alkohol sa manjim brojem estarskih veza, i na kraju glicerol. U sredinama sa niskim sadržajem vode, lipaze mogu da katalizuju i reakciju stvaranja estarske veze između hidroksilne grupe alkohola i karboksilne grupe karboksilnih kiselina u reakciji esterifikacije. Zbog sposobnosti da katalizuju reakcije hidrolize i esterifikacije, lipaze se često koriste u reakcijama transesterifikacije (slika 2.8) [31-33]. Međutim, lipaze su podjednako efikasni katalizatori i u reakcijama sinteze amida i šećernih estara, a treba pomenuti i reakcije koje se ne smatraju kao “normalne” za lipaze, poput epoksidacije i adicije aldola [3, 34, 35].



Slika 2.8. Reakcije katalizovane lipazama.

Dugo se smatralo da je osnovna karakteristika lipaza koja ih razlikuje od esteraza, aktivacija na granici faza i prisustvo polipeptidnog lanca koji se ponaša kao "poklopac". Međutim, postoje lipaze koje se ne aktiviraju na granici faza, pa se pod lipazama podrazumevaju enzimi koji imaju veliki afinitet prema estrima kiselina dugog lanca, koji su nerastvorni u vodi. Kako nije jasno definisano šta se podrazumeva pod kiselinom dugog lanca Jeger je predložio da to budu kiseline sa minimum od 10 C atoma [36, 37].

Budući da je osnovna biološka funkcija lipaza da potpomognu razgradnju masti, one su sveprisutne u prirodi i proizvode ih razne biljke, životinje i mikroorganizmi (slika 2.9). Lipaze su prisutne i u ljudskom organizmu i najčešće nalaze u pankreasu, želucu i jetri, gde učestvuju u hidrolizi triglicerida [3].



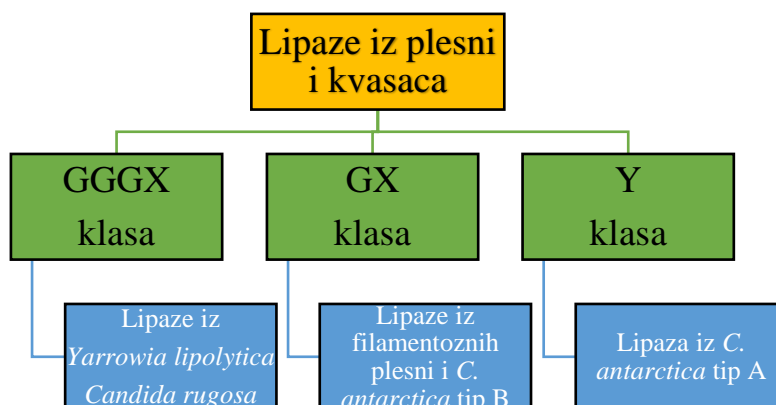
Slika 2.9. Grafički prikaz raspodele producenata lipaza [10].

Međutim, za proizvodnju industrijskih enzima najinteresantniji izvor lipaze predstavljaju mikroorganizmi. Razlog je dobijanje enzima u visokom prinosu, lakoća izvođenja genetičkih manipulacija, redovno snabdevanje enzimima koje ne zavisi od sezonskih fluktuacija, brz rast mikroorganizama na jeftinim podlogama, kao i velika raznovrsnost u katalitičkoj aktivnosti [38]. Priroda daje širok biodiverzitet mikrobioloških resursa, koji pružaju impresivan potencijal za proizvodnju enzima sa specifičnim karakteristikama. Iz tog razloga više od 50% industrijskih enzima je mikrobnog porekla, a čak 75% industrijskih enzima čine hidrolaze [39]. Treba napomenuti da su samo 2% mikroorganizama na planeti ispitani kao producenti enzima [38].

Od porekla lipaza u velikoj meri zavise i njihove fizičko-hemijske osobine, tako da animalne lipaze imaju pH optimum u slabo baznoj sredini (između 8 i 9), dok pH optimumi lipaza mikrobnog porekla pokrivaju nešto veći pH opseg od 5,6-8,5 [3]. U novije vreme sve veću pažnju privlače lipaze biljnog porekla sa molekulskim masama u opsegu od 19-270 kDa, koje su stabilne u pH opsegu od 4-9 i na temperaturama od 25-60°C [40]. Osnovna prednost primene lipaza biljnog porekla u odnosu na mikrobne lipaze nalazi se u lakšoj prihvatljivosti ovih enzima za proizvodnju namirnica za ljudsku upotrebu. Takođe, postoji perspektiva za primenu sirovih ekstrakata biljaka, čime se u mnogome smanjuju troškovi prečišćavanja enzima [40].

### 2.3.1 Struktura, klasifikacija i mehanizam delovanja lipaza

Prva klasifikacija lipaza izvedena je na bakterijskim lipazama i bila je zasnovana na topologiji proteina. Prema ovoj podeli lipaze su svrstane u osam familija, od kojih šest imaju strukturu  $\alpha/\beta$  hidrolaza, dok ostale dve familije, II i VII, imaju strukturu SGNH-hidrolaza i  $\beta$  laktamaze. Ova klasifikacija je revidirana više puta, i trenutno postoji XVI familija koje su deo ESTHER baze koja sadrži informacije o superfamiliji  $\alpha/\beta$  hidrolaza. U skorije vreme počela je da se koristi LED baza (Lipase Engineering Database-LED) koja pored bakterijskih lipaza u obzir uzima i lipaze iz gljiva, kvasaca i sisara. Prema ovoj bazi, lipaze se dele u tri klase na osnovu oksianjon otvora, a one se dalje dele na superfamilije na osnovu konzerviranog pentapeptida. Na slici 2.10 je prikazana klasifikacija lipaza iz kvasaca i plesni, međutim pored navedenih u klasi GGGX postoje još 4 super familije, klasa GX ima još 25 super familija dok klasa Y ima još 4 superfamilije [39, 41, 42].



Slika 2.10. Klasifikacija lipaze na primeru lipaza iz gljiva i kvasaca [11, 14].

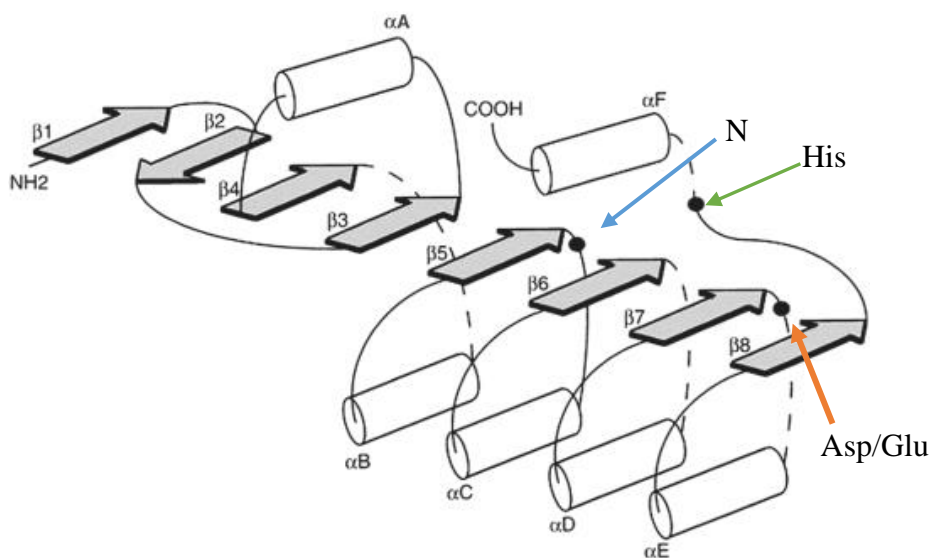


Iako lipaze pokazuju veliku raznovrsnost u veličini molekula i primarnoj strukturi, lipaze poseduju veoma slične konformacione modele [39]. Pripadaju strukturnoj superfamiliji  $\alpha/\beta$  hidrolaza [41, 43], u koju još spadaju i esteraze, proteaze, dehalogenaze, epoksid hidrolaze i peroksidaze [39, 44]. Za  $\alpha/\beta$  hidrolaze je karakteristično postojanje centralne  $\beta$  naborane ploče, koja se sastoji iz 8 paralelnih  $\beta$  listova, sa izuzetkom  $\beta 2$  lista koji je antiparalelan u odnosu na ostale, kao što je slučaj kod lipaze iz *Rhizomucor miehei* i *Rhizopus niveus* [39, 41, 42, 45, 46]. Međutim broj i položaj  $\beta$  listova i njihova orijentacija može da varira, pa tako lipaza B iz *C. antarctica*, lipaza YLip2 iz *Y. lipolytica* i lipaza iz *C. rugosa* (CRL1–3) imaju 9, 7 i 11  $\beta$  listova, respektivno od kojih je jedan antiparalelan, a lipaze iz *Geotrichum candidum* i *Malassezia globosa* (SMG1) imaju 14 i 8  $\beta$  listova od kojih su dva antiparalelna. Lipaza iz *Bacillus subtilis* Lip A se smatra za najmanji enzim iz grupe  $\alpha/\beta$  hidrolaza, jer sadrži samo 6  $\beta$  listova [41, 47].

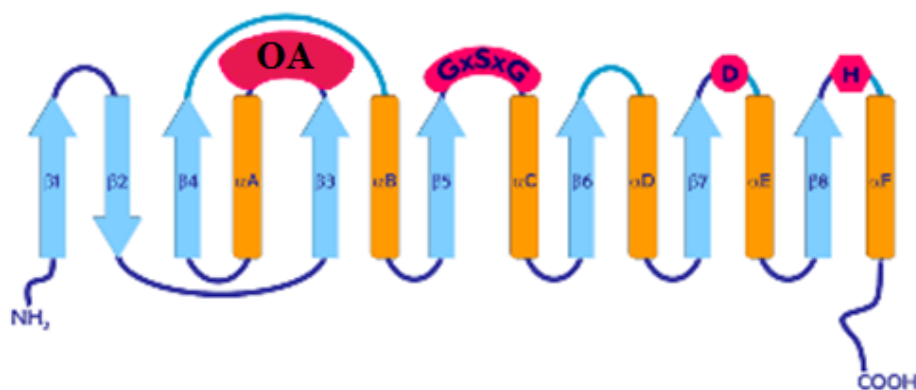
Centralno postavljena  $\beta$  ploča zavija ulevo praveći ugao od  $90^\circ$  između prvog i poslednjeg  $\beta$  lista. Listovi od  $\beta 3$  do  $\beta 8$  su povezani  $\alpha$  heliksima (Slika 2.11), gde se  $\alpha$  heliksi od A i F nalaze sa konkavne strane  $\beta$  naborane ploče, dok se heliksi B, C, D i E nalaze sa konveksne strane. Jedina poznata sekvenca koja je zajednička za sve lipaze je pentapeptid  $S_m$ -X-Ser-X- $S_m$  u kom je lociran serin iz aktivnog centra (slika 2.12).  $S_m$  je najčešće ostatak glicina, ali u nekim slučajevima može da bude zamenjen alaninom, valinom, serinom ili treoninom, dok X-može da bude ostatak bilo koje aminokiseline [44]. Pomenuti pentapeptid formira veoma oštar  $\gamma$  zavoje između lista  $\beta 5$  i  $\alpha$  heliksa C koji se naziva “nukleofilni lakat”. Ostatak asparaginske kiseline, ili glutaminske u slučaju *Geotrichum candidum*, se najčešće nalazi iza  $\beta 7$  lista centralne  $\beta$  ploče, dok se kod nekih lipaza nalazi iza  $\beta 6$  lista [43, 48]. Ovaj aminokiselinski ostatak je vodoničnim vezama spojen sa ostacima histidina iz aktivnog centra koji se nalazi u petlji iza  $\beta 8$  lista [39, 44].

Još jedna od važnih karakteristika lipaza je oksianjon otvor, koji predstavlja “džep” u kome dolazi do stabilizacije negativno naelektrisanog tetraedarskog intermedijera koji nastaje u hidrolizi estarske veze. Oksianjon otvor se sastoji od dva aminokiselinska ostatka, od kojih se jedan uvek nalazi iza nukleofilnog ostatka, dok drugi ima varijabilnu poziciju [39]. Kod GX klase lipaza aminokiselinski ostatak koji može da menja položaj je C-terminalni sused glicina iz katalitičkog lakta. Kod GGGX klase, ovaj aminokiselinski ostatak je pomeren za jedno mesto ka C-terminalnom kraju u odnosu na GX klasu i

predstavlja glicin iza kojeg sledi hidrofobni ostatak X iz konzervirane sekvence. U Y klasi aminokiselinski ostatak koji može da menja položaj je ostatak tirozina [39].



Slika 2.11. Struktura  $\alpha/\beta$  hidrolaza.  $\alpha$  heliksi su predstavljene cilindrima,  $\beta$  listovi su predstavljene osenčenim strelicama. Položaj aminokiselinskih ostataka iz aktivnog centra je obeležen krugovima [21].



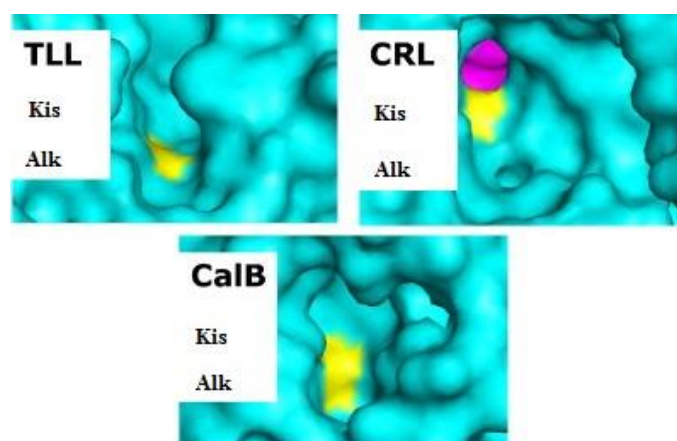
Slika 2.12. Struktura  $\alpha/\beta$  hidrolaze.  $\beta$  listovi su prikazani strelicama, a  $\alpha$  heliksi cilindrima. Na slici su prikazani i katalitički histidin, asparaginska kiselina, oksianjon otvor (OA) i GXSXG sekvencija [11].

Reakcija hidrolize se odvija tako što kiseonik iz katalitičkog serina napada ugljenikov atom karbonilne grupe estera, pri čemu nastaje tetraedarski intermedijer, koji sa azotom iz "oksianjon otvora" formira vodonične veze [44]. Pored serina, u formiranju kompleksa enzim-supstrat važnu ulogu imaju asparaginska kiselina i histidin. Ove tri aminokiseline čine tzv., katalitičku trijadu karakterističnu za lipaze [3]. Molekul alkohola zatim napušta acil enzim kompleks, koji se na kraju hidrolizuje pri čemu nastaju masna kiselina i

slobodan enzim [3, 37, 43, 44]. Peterson i saradnici su pomoću elektrostatičkog mapiranja površine enzima objasnili kako dolazi do oslobađanja masne kiseline iz aktivnog centra enzima, a sam proces nazvali “elektrostatički katapult” [44, 49]. Naime, oni su pokazali da je aktivni centar većine lipaza negativno naelektrisan u njihovom optimalnom pH opsegu (pH 6-10), pa prilikom raskidanja estarske veze nastala jonizovana karboksilna kiselina biva odmah izbačena iz aktivnog centra usled elektrostatičkog odbijanja [49].

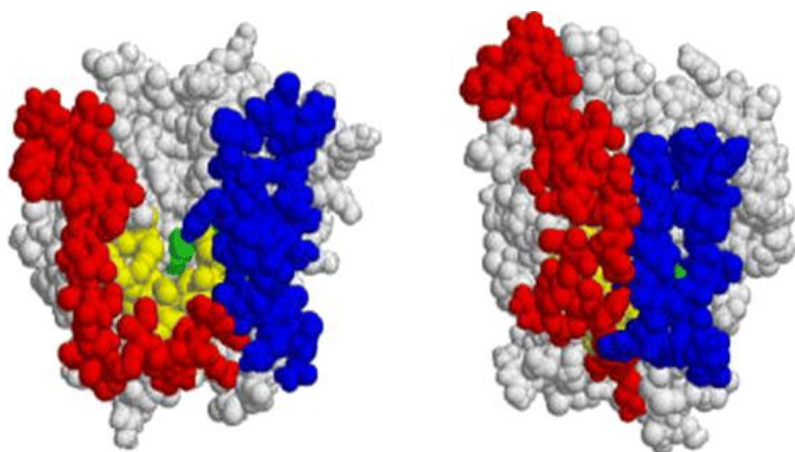
Iako se pri stvaranju kompleksa enzim-supstrat formira veza između karbonilne grupe i hidroksilne grupe serina iz katalitičke trijade, na reaktivnost enzima ima uticaj dužina lanca, broj i pozicija dvostrukih veza, vrsta i broj supstituenata supstrata. U primeni lipaza to se registruje kao različit afinitet lipaza prema različitim supstratima [3]. Na aktivnost lipaze utiče i hidrofobnost enzima, pa se tako promenom hidrofobnosti aminokiselina u vezujućem “džepu” utiče na selektivnost enzima, orijentaciju supstrata i stepen vezivanja supstrata za aktivni centar [42].

Neki istraživači dele lipaze prema obliku aktivnog centra, a ove razlike između različitih podgrupa verovatno utiču na njihov afinitet prema različitim supstratima. Prema Plajsu i sar. lipaze se mogu podeliti u tri podgrupe (slika 2.13): lipaze sa aktivnim centrom tunelskog oblika (npr. lipaza iz *C. rugosa*), lipaze sa aktivnim centrom oblika levka (lipaze iz *C. antarctica*, *Pseudomonas* sp., pankreasne lipaze) i lipaze sa potpuno otvorenim aktivnim centrom (lipaze iz *Rhizomucor* i *Rhizopus* sp.)[50].



Slika 2.13. Poređenje oblika aktivnih centara lipaza iz različitih podgrupa. Katalitički serin je prikazan žutom bojom, deo za vezivanje kiseline okrenut je na gore, a deo za vezivanje alkohola je okrenut naniže [51].

Za većinu lipaza je karakteristično postojanje mobilnog poddomena, tzv. "poklopca" koji kontroliše pristup molekula supstrata aktivnom centru [44]. Ovaj peptidni lanac je različitog sastava, dužine i oblika kod lipaza različitog porekla, ali je za sve karakteristično da ima amfifilne osobine. Podaci dobijeni metodom rendgenske kristalografije pokazali su da većina enzima koji se svrstavaju u ovu grupu poseduju jedan peptidni lanac (u formi  $\alpha$ -heliksa) koji u vodenom rastvoru zaklanja aktivni centar. Neki autori tvrde da je "poklopac" odgovoran za postojanje aktivacije lipaze na granici hidrofilne i hidrofobne faze, kao i da drastično utiče na aktivnost i selektivnost lipaze. Kada se enzim nalazi u vodenoj sredini, "poklopac" je zatvoren, a aktivni centar enzima nije dostupan za supstrat. Prilikom kontakta sa hidrofobnim supstratom ili na granici faza ulje-voda/rastvarač-voda, lipaze podležu konformacionim promenama prilikom kojih dolazi do otvaranja poklopca i tom prilikom aktivni centar postaje dostupan za rastvarač i supstrat [3, 39, 41, 42, 44]. Međutim, ne podležu sve lipaze aktivaciji na granici faza, tako lipaza B iz *C. antarctica* ne pokazuje značajnu aktivaciju na granici faza, ali se kod ovog enzima otvaranje "poklopca" povezuje sa njegovom psihrofilnom prirodom, pa tako do konformacionih promena dolazi kada se povećava temperatura [42]. Lipaze iz *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, kao i lipaza iz gvinejskog praseta uopšte nemaju "poklopac", pa tako ne podležu aktivaciju na granici faza [39]. S druge strane lipaza iz *Pseudomonas* poseduje dva "poklopca", gde se drugi "poklopac" ponaša kao okidač za pomeranje prvog "poklopca" (slika 2.14)[39, 41].



Slika 2.14. Pomeranje "poklopca" kod lipaze iz *P. aeruginosa*. S leve strane je prikazana otvorena konformacija u kojoj se vidi aktivni centar enzima, dok je s desne strane prikazana zatvorena konformacija enzima iz koje se vidi da se zatvaranjem "poklopca" gubi gotovo 100% površine dostupne rastvaraču. Ostaci aminokiselina u vezujućem džepu su prikazani žutom bojom, dok su amino kiseline u "poklopcu" jedan prikazane crvenom bojom, a "poklopcu" dva plavom [41, 52].

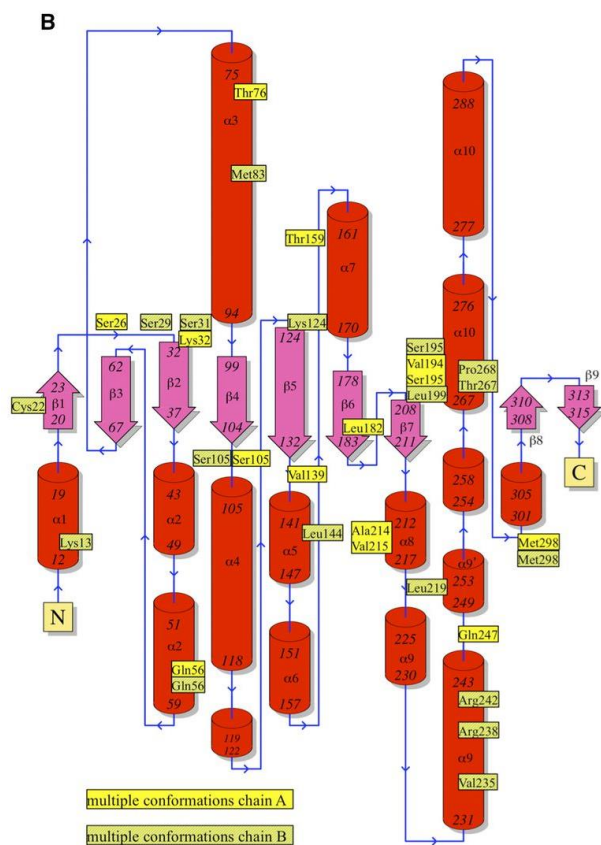
### 2.3.2 Lipaza iz *C. antarctica* izoforma B

Kvasac *C. antarctica* je producent dva izoenzima lipaze, lipaze A i B. Prvobitno je izolovan iz jezera Vanda na Antarktiku koje je cele godine prekriveno ledom, a kasnije je izolovan i iz drugih prirodnih izvora [3]. Lipaza A (CALA) i Lipaza B (CALB) se bitno razlikuju u strukturi, katalitičkoj aktivnosti i ponašanju na granici faza. Kao i većina lipaza, izoenzim A podleže aktivaciji na granici faza, dok kod izoenzima B ne dolazi do klasične aktivacije na granici faza, pa je dugo smatran intermedijerom između esteraza i lipaza [53].

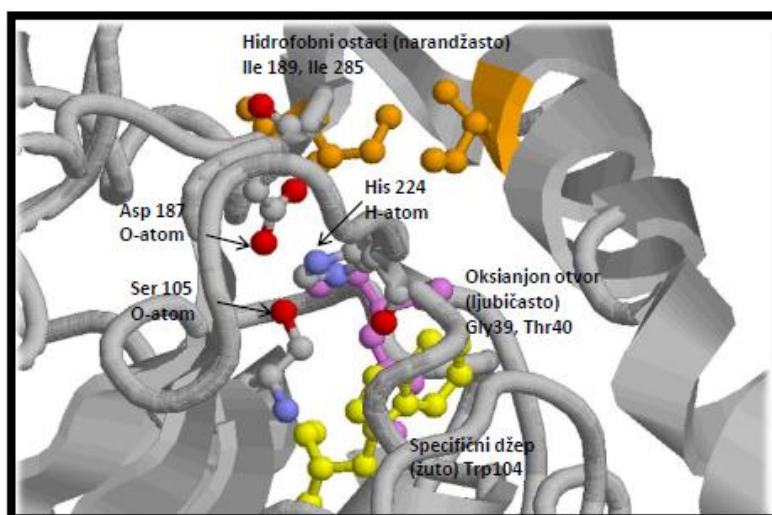
Zanimljiva svojstva i veliki potencijal CALB kao biokatalizatora, često se spominju u literaturi, dok s druge strane izostaju primeri o njegovoj industrijskoj primeni. Visoka cena komercijalnih preparata ovog enzima, Novozyme 435 (proizvođač: Novo Nordisk) i Chirazyme (Roche Molecular Biochemicals), razlog su njegove male industrijske primene [3].

Trodimenzionalnu strukturu ovog enzima odredili su Upenberg i saradnici sredinom devedesetih godina prošlog veka primenom metode rendgenske kristalografije [54]. CALB pripada klasi  $\alpha/\beta$  hidrolaza, koje imaju centralni hidrofobni deo molekula koji se sastoji od  $\beta$  listova okruženih sa dva sloja amfifilnih  $\alpha$  heliksa. Za razliku od većine lipaza, ovaj enzim ima 7  $\beta$  listova [44]. Molekulska masa lipaze B je 33 kDa, a ima dimenzije  $30 \times 40 \times 50$  Å. Sastoji se od 317 aminokiselinskih ostataka i ima izoelektričnu tačku na pH 6,0 [55]. Sekundarna struktura enzima, prikazana je na slici 2.15.

Katalitička trijada izoenzima B lipaze iz *C. antarctica*, karakteristična za sve serin hidrolaze, sastoji se od serina u položaju 105, histidina u položaju 224 i asparaginske kiseline u položaju 187 (slika 2.16). Utvrđeno je da se ova lipaza razlikuje u sekvenci konzerviranog pentapeptida u kom je lociran katalitički serin, gde je prvi glicin zamenjen treoninom, pa je sekvenca ovog peptida TWSQG [44]. Otvor u kojem se nalazi katalitička trijada ima oblik levka dimenzija  $9,5 \times 4,5$  Å i čine ga dva paralelna kanala u koje se smeštaju acil grupe kiseline i alkohola. Kanali su razdvojeni hidrofobnim ostacima izoleucina u položajima 189 i 285. U kanalu u kojem se vezuje alkohol, nalazi se i deo, koji se naziva "stereospecifični džep", odgovoran za enantioselektivnost ovog enzima prema hirlnim sekundarnim alkoholima [56, 57].



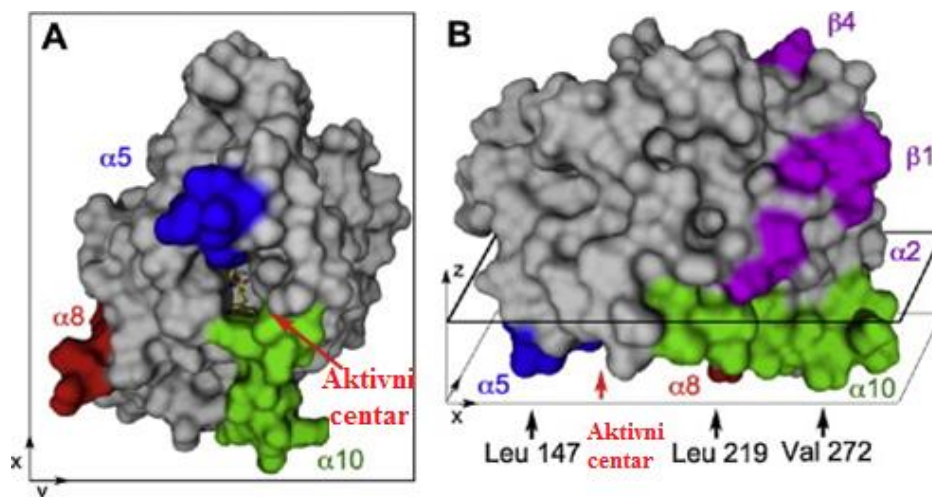
Slika 2.15. Dijagram sekundarne strukture lipaze B iz *C. antarctica* [27].



Slika 2.16. Aktivni centar lipaze B iz *C. antarctica* [57].



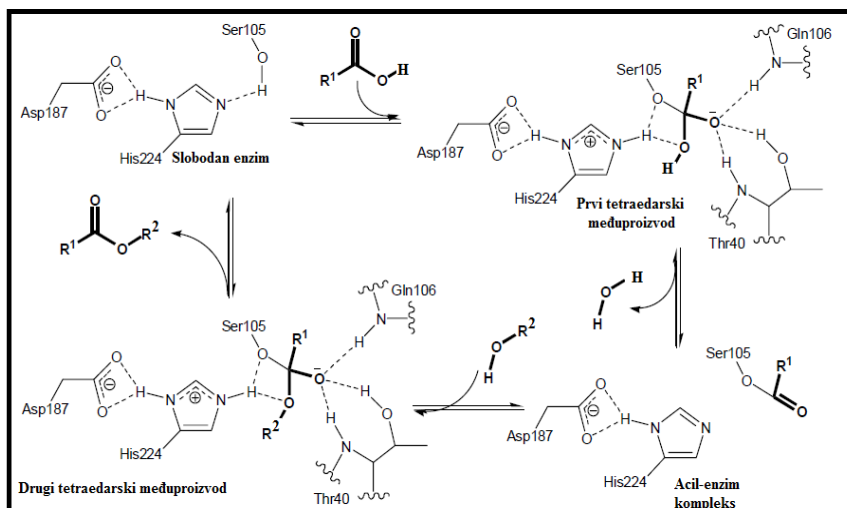
Karboksilne kiseline do C4 se vezuju u usku pukotinu na dnu aktivnog centra koja je hidrofilne prirode zahvaljujući prisustvu serina iz katalitičke trijade, zajedno sa ostatkom asparaginske kiseline u položaju 134. Ovu pukotinu, u kojoj se vezuje karboksilna grupa, formiraju s leve strane treonin (138), izoleucin (189) i valin (190), a sa desne strane treonin (40) iz oksianjon otvora i glicin (157). Deo koji okružuje region molekula supstrata od C7-C13 je hidrofoban, jer ga formiraju hidrofobne alifatične aminokiseline: dva ostatka valina (149 i 154), po jedan ostatak leucina (144) i izoleucina (285) [3, 50]. Širina otvora se sužava u ovom delu i dostiže minimum na mestu gde se vezuje 13. C atom acil donora. U nekoliko istraživanja je ustanovljeno da ovaj enzim ima veliki afinitet prema masnim kiselinama kratkog i srednjeg lanca, a da afinitet opada sa povećanjem broja ugljenikovih atoma preko 14. Utvrđeno je i da ova lipaza ima "poklopac" na osnovu pomeranja  $\alpha$  heliksa 5 [54], međutim kako ova lipaza ne podleže klasičnoj aktivaciji na granici faza Hult je izložio pretpostavku da ovaj heliks učestvuje u vezivanju proteina za hidrofobnu površinu [58]. Gruber i Pleis su potvrdili ovu pretpostavku pokazavši da ovaj  $\alpha$  heliks, zajedno sa heliksima  $\alpha$  8 i  $\alpha$  10, čini tzv. "sidro" regione (slika 2.17), koji imaju ulogu u vezivanju enzima na granici faza [53]. Iz ovih "sidro" regiona se izdvajaju dva leucina (147, 219) i valin (272) koji formiraju virtuelnu ravan na ulazu u aktivni centar enzima. Autori ističu da su vezivanja enzima za granicu faza, kao i konformacione promene do kojih tom prilikom dolazi ključne u razumevanju specifičnosti enzima i njegove povećane aktivnosti na granici faza [53]. Funkcija  $\alpha$  heliksa 5 i 10, i postojanje otvorene i zatvorene konformacije lipaze B, i dalje ostaje jedna od glavnih dilema i uzrok polemika u naučnom svetu. Zisis i saradnici su izneli novu teoriju da se u prisustvu malih supstrata lipaza B ponaša kao esteraza, dok se u prisustvu velikih razgranatih alkoholnih supstrata ponaša kao lipaza, tj. poseduje otvorenu konformaciju koja je favorizovana u hidrofobnoj sredini [59].



Slika 2.17. Hidrofobni regioni CALB: "sidro" aminokiseline leucin 147, 219, i valin 272 locirane u heliksi  $\alpha 5$  (plav),  $\alpha 8$  (crveno) i  $\alpha 10$  (zeleno) koje okružuju ulaz u aktivni centar (serin 105, histidin 224 i triptofan 104 prikazani kao žuti štapići).

Katalitički ciklus sinteze estra sa CALB započinje reverzibilnim vezivanjem prvog supstrata za enzim, formirajući tzv. Michaelis- Mentenov kompleks. Nakon pravilnog pozicioniranja supstrata dolazi do nukleofilnog napada serina u položaju 105 na karbonilnu grupu supstrata, i formiranja prvog tetraedarnog intermedijera. U tetraedarnom intermedijeru negativno naelektrisan kiseonik iz karboksilne grupe supstrata stabilizovan je trostrukom vodoničnom vezom sa oksianjon otvorom, dok je pozitivno naelektrisan histidin u položaju 224, stabilizovan interakcijama sa asparaginom u položaju 187. Nakon toga se proton sa histidina (224) prenosi na kiseonik i formira molekul vode koji napušta aktivni centar, a kao proizvod ove faze nastaje acil-enzim kompleks. Drugi tetraedarni intermedijer se formira napadom nukleofila (alkohola) na acil-enzim kompleks. Tokom ovog procesa, proton se sa nukleofila prenosi na histidin (224), pri čemu nastaje alkoksidni anjon. Ovaj anjon napada karbonilni ugljenikov atom pri čemu nastaje drugi tetraedarni intermedijerni oksianjon koji je ponovo stabilisan uspostavljanjem vodoničnih veza. Proton zatim sa histidina (224), prelazi na alkil-kiseonik serina (105), i formira se karboksilna veza u supstratu. Kao rezultat nastaje slabo vezan enzim-proizvod kompleks, i nakon oslobađanja proizvoda regeneriše se slobodan enzim (slika 2.18) [3, 60].



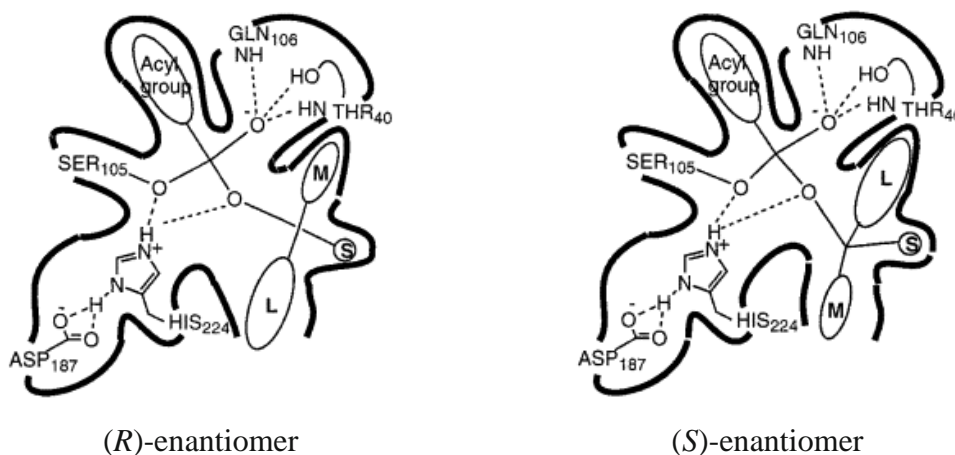


Slika 2.18. Mehanizam reakcije esterifikovanja katalizovane sa CALB [57]

Trodler i Plajs su pomoću molekulske dinamike želeli da steknu uvid u strukturu i fleksibilnost molekula CALB u vodi i nekoliko organskih rastvarača [61]. Pokazalo se da je fleksibilnost CALB u organskim rastvaračima manja nego u vodi, i opada sa povećanjem  $\log P$ -a i povećanjem dijalektrične konstante, dok je struktura molekula ostala nepromenjena u svim ispitivanim rastvaračima. Pokazalo se da se oblasti enzima u kojima se menja fleksibilnost u različitim rastvaračima nalaze na površini molekula i to su: kratki  $\alpha$  heliks (aminokiselinski ostaci 139–150), dug  $\alpha$  heliks (aminokiselinski ostaci 266–289) koji formira ulaz u aktivni centar i tri površinske petlje (aminokiselinski ostaci 26-30, 92-97 i 215-222). Hidrofilna površina molekula se u organskim rastvaračima smanjila za 10%, dok se hidrofobna povećala za 1%, što može biti objašnjenje za povećanu fleksibilnost CALB u vodi, jer se u vodi polarni ostaci aminokiselina okreću ka površini i povećavaju hidrofилnu površinu molekula, čime se smanjuju polarne intramolekulske interakcije koje stabilizuju rigidnu konformaciju proteina. S druge strane, u nepolarnim rastvaračima dolazi do smanjenja hidrofилne površine, što dovodi do boljeg pakovanja aminokiselinskih ostataka i povećane stabilnosti enzima [61]. Međutim smanjena fleksibilnost CALB u organskim rastvaračima nema veze samo sa interakcijama rastvarač-enzim, već i sa interakcijama rastvarača i vode na površini enzima. Kod polarnih rastvarača, molekuli rastvarača formiraju vodonične veze sa molekulima vode odvlačeći vodu sa površine enzima, dok kod nepolarnih rastvarača dolazi do hidrofobne hidratacije, kada nepolarne grupe rastvarača favorizuju interakcije između samih molekula vode, čime se voda "zamrzava" u klasterima oko hidrofobne površine [61]. Li i

Jang su pokazali da molekuli vode u aktivnom centru CALB utiču na selektivnost lipaze prema supstratima [62]. Oni su pokazali da manji broj molekula vode u vezujućem "džepu" znači veći afinitet prema supstratu. Svoje zapažanje su objasnili činjenicom da hidrofilni molekuli vode mogu da naruše hidrofobne interakcije supstrata i aktivnog centra enzima, ali i da više molekula vode ukazuje na veći prostor između supstrata i aktivnog centra, što znači da se oni ne uklapaju kako treba. Pored molekula vode na specifičnost CALB utiče i jačina vodoničnih veza između His224-N<sub>ε</sub>H i kiseonika alkohola, kao i His224-N<sub>ε</sub>H-Ser-O<sub>γ</sub> koje utiču na transfer protona u katalitičkom procesu [62].

Lipaza B iz *C. antarctica* ispoljava visoku regio- i enantiospecifičnost, pa je najšira oblast primene ovog enzima razdvajanje racemskih smeša alkohola, amina i kiselina, i dobijanje optički aktivnih jedinjenja iz mezo reaktanata. Generalno se za ovaj enzim može reći da pokazuje dobro razdvajanje enantiomera, ukoliko je jedan od supstituenata (a da nije vodonik) u hiralnom centru veći, a drugi manji od *n*-propil grupe. U tom slučaju kao rezultat Čan-Ingold-Prelog pravila, prednost imaju (*R*)- nukleofili u odnosu na (*S*)-nukleofile (slika 2.19) [57, 60, 63]. Naime, prilikom vezivanja za aktivni centar enantiomeri zauzimaju različitu orijentaciju, pa se tako alkil grupa (*R*) enantiomera okreće van aktivnog centra, dok je u slučaju (*S*) enantiomera usmerena ka aktivnom centru. Zbog toga se enantioselektivnost enzima drastično menja sa porastom broja C-atoma alkil grupe, jer kod (*R*) enantiomera zbog orijentacije molekula povećanje alkil grupe ne dovodi do smanjenja brzine reakcije, a kod (*S*) enantiomera sterna smetnje dovode do drastičnog pada brzine [64].



Slika 2.19. Vezivanje (*R*)- i (*S*)- enantiomera [37].

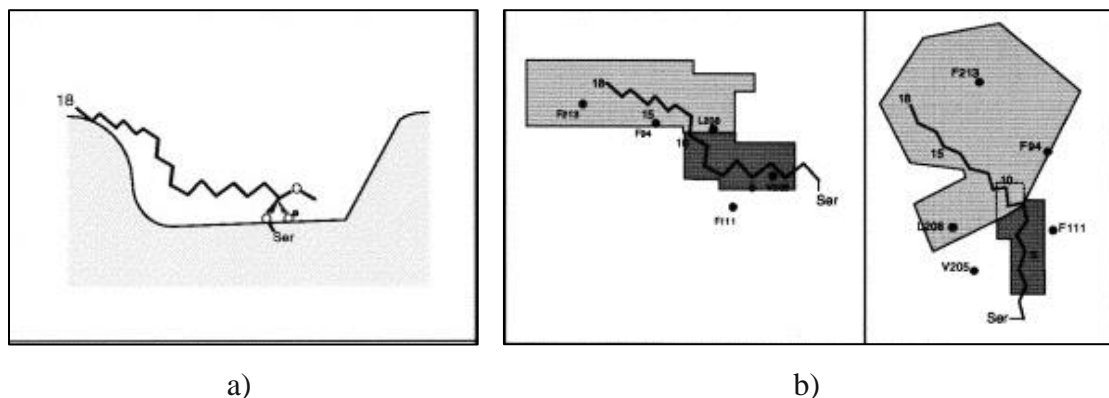
### 2.3.3 Lipaza iz *R. miehei*

Ekstracelularna lipaza iz plesni *R. miehei* je prvi put izolovana 1973. godine. Ovaj enzim je komercijalno dostupan u slobodnom i imobilisanom obliku i karakteriše se visokom aktivnošću i stabilnošću pod različitim eksperimentalnim uslovima. Imobilisani preparat kompanije Novozyme, Lipozyme RM IM, spada u grupu najviše primenjivanih preparata lipaze i to posebno u reakcijama esterifikacije, jer izabran nosač koji omogućuje da se voda koja nastaje u reakciji uklanja iz reakcione smeše, a da pri tome ne narušava monomolekulski sloj vode oko enzima [3]. Slaba anjonska jonoizmenjivačka smola, fenol-formaldehidni kopolimer Duolite ES 562 koristi se kao nosač za imobilizaciju ovog preparata. Ista kompanija komercijalno proizvodi i slobodnu lipazu pod nazivom Palatase 2000L. Industrijska primena ovog enzima orijentisana je ka prehrambenoj industriju i to u modifikaciji masti i ulja [65].

Lipaze, iz *R. miehei* prva je lipaza čija je trodimenzionalna struktura rasvetljena i to početkom devedesetih godina primenom rendgenske kristalografije [46, 66]. Ovaj enzim sastoji se iz 269 aminokiselinskih ostataka koji zauzimaju veoma neobičan prostorni raspored. Naime, centralna  $\beta$  ploča, sastavljena od uglavnom paralelnih  $\beta$  listova je asimetrična, jer su sve petlje koje spajaju  $\beta$  listove locirane sa jedne strane ploče, dok s druge strane  $\beta$  ploče potporu obezbeđuje N-terminalni  $\alpha$  heliks. Molekul je stabilizovan sa tri disulfidne veze (ostaci 29-268, 40-43, 235-244) [66]. Katalitičku trijadu enzima, čine histidin u položaju 257, asparaginska kiselina u položaju 203 i serin u položaju 144. Aktivni centar dimenzija  $18 \times 8 \times 6$  Å [67], zaklonjen je "poklopcem" koji čine ostaci aminokiselina u položajima od 82-96. Pomeranje "poklopca" je zglobni kruti pokret u kom dolazi do transporta kratkog  $\alpha$  heliksa koji čine aminokiseline u položajima od 85-91 za 12 Å [65]. Kao rezultat ovog pokreta hidrofobna površina koja čini 8% ukupne površine molekula biva izložena. Metodom molekulske dinamike je utvrđeno da arginin iz "poklopca" u položaju 86 stabilizuje otvorenu konformaciju preko vodoničnih veza sa površinom enzima. Pored arginina u položaju 86, asparaginska kiselina u položaju 96 formira jake elektrostatičke interakcije sa ostatkom proteina. Ovaj aminokiselinski ostatak je samo deo elektrostatičke mreže koja je važna za funkcionisanje enzima, a u kojoj još učestvuju ostaci iz katalitičke trijade, ostatak tirozina (260) u neposrednoj blizini

aktivnog centra, ostaci koji učestvuju u stabilizaciji geometrije aktivnog centra tirozin (28) i histidin (143), i ostatak arginina u položaju 80 [65].

Masne kiseline dužine lanca do C8, vezuju se za katalitički serin (144) u pukotini na dnu otvora u kom se nalazi aktivni centar, a koji formiraju i ostaci prolina (177) i histidina (108). S leve strane se nalazi ostatak valina (205), dok se sa desne strane nalazi asparaginska kiselina (91). Zahvaljujući interakcijama acil-donora sa ostacima prolina (209 i 210), fenilalanina (94 i 213) i leucina (208) dolazi do deformisanja konformacije supstrata u regionu C8-C10 koje omogućuje vezivanje supstrata velike molekulske mase (slika 2.20). Zbog ovakvog oblika i dimenzija aktivnog centra lipaza iz *R. miehei* ima afinitet prema kiselinama dugog lanca koje se lako smeštaju u ovaj dobro definisani hidrofobni otvor [3, 50].



Slika 2.20. Šematski prikaz aktivnog centra lipaze iz *R. miehei* sa vezanim molekulom masne kiseline [22].

### 2.3.4 Upotreba lipaza

Zahvaljujući činjenici da efikasno katalizuju veliki broj različitih reakcija, uz izuzetnu hemo, regio-i enantioselektivnost, lipaze su veoma interesantan enzim sa industrijske tačke gledišta. U prilog lipazama ide i njihova velika stabilnost, aktivnost u organskim rastvaračima, kao i činjenica da za njihovu aktivnost nisu neophodni skupi kofaktori [68]. Takođe, lipaze se lako mogu dobiti u visokom prinosu iz različitih mikroorganizama, pre svega gljiva i bakterija, a s obzirom da je poznata kristalna struktura velikog broja lipaza, moguće je unaprediti karakteristike enzima upotrebom tehnika racionalnog dizajna [69]. Interesovanje za ovim neverovatnim enzimom datira iz XIX veka, kada je prvi put

otkriven, međutim pravi potencijal ovog enzima prepoznaje Haldan istakavši da se mogući supstrati za lipaze mogu brojati u milionima [70]. Kao što je napomenuo eminentni biohemičar, raznolikost u potencijalnim supstratima je gotovo neograničena pa je ovaj enzim postao jedan od najbitnijih industrijskih enzima. Ukoliko se u obzir uzme ekonomski faktor, najbitnija grana industrije u kojoj se koriste lipaze je industrija detergenata, a prati je industrija hrane i pića. Pored toga, lipaze se koriste u farmaceutskoj industriji za dobijanje čistih enantiomera, a u poslednjih 10 godina lipaze se primenjuju i u proizvodnji alternativnog izvora energije, biodizela [68].

#### **2.3.4.1 Upotreba lipaza u detergentima**

Primena enzima u detergentima ima niz prednosti: biodegradabilni su, smanjuje se potrošnja energije omogućavanjem rada na nižim temperaturama, omogućava smanjenje koncentracije nepoželjnih jedinjenja u detergentima i njihovim razlaganjem ne nastaju štetni proizvodi. Savremeni detergentski sadrže lipaze, proteaze, amilaze i/ili celulaze [3]. Lipaze koje se koriste u industriji detergenata treba da ispune niz zahteva poput stabilnosti i aktivnosti pri visokim pH i temperaturama iznad 40 °C, treba da poseduju široku specifičnost i da budu kompatibilne sa ostalim sastojcima detergenata tj. metalnim jonima, proteazama, surfaktantima i oksidujućim agensima [44]. Komercijalno korišćenje lipaze u industriji detergenata započinje 1988. godine, kada kompanija Novo Nordisk A/S na tržište izbacuje preparat Lipolase® [68]. Producent je bila plesan *Thermomyces lanuginosus*, međutim, tek su metode genetskog inženjerstva omogućile da se ova lipaza proizvodi u dovoljnoj meri nakon insercije odgovarajućeg gena u plesan *Aspergillus oryzae*. Nakon toga i druge kompanije na tržište plasiraju različite komercijalne preparate lipaze, poput Lipomaxa koji je razvio Genecor [68], a koji sadrži lipazu iz *P. alcaligenes* [71]. Od tada pa do danas, velike kompanije i dalje rade na novim poboljšanim preparatima, pa je tako interesantan podatak da je tek 10% patenata vezanih za primenu lipaze u industriji detergenata vezan za institute i univerzitete, a ostali su u vlasništvu velikih kompanija kao što je prikazano u tabeli 2.1. Podatak iz 2014. godine pokazuje kako je profit Novozymes, kompanije koja drži 60% svetskog tržišta enzima koji se primenjuju u detergentima, porastao za 4% i sada čini čak 35% profita ove kompanije [68].

Tabela 2.1. Nosioci patenata vezanih za primenu lipaze u detergentima u periodu od 1983-2012 [44].

Nosilac patenta	Broj patenata
Procter & Gamble	72
Unilever	42
Lion Corporation	33
Novozymes	33
Novo Nordisk	26
Henkel	20
Kao Corporation	15
Genecor	10
Clorox	8
Showa Denko	8

#### 2.3.4.2 Upotreba lipaze u farmaceutskoj industriji

Od posebnog je značaja stereoselektivno dejstvo lipaze koje se koristi u razdvajanju racemskih smeša optičkih izomera u farmaceutskoj industriji, industriji agrohemikalija, pesticida i herbicida. Naime, većina lekova su hiralni molekuli, gde je najčešće samo jedan enantiomer biološki aktivan, pa je primena lipaze za dobijanje optički čistih izomera oblast koja se neprestano razvija. U prilog ide i stabilnost i aktivnost lipaze u organskim rastvaračima, pa se tako prvi radovi vezani za enzimsko izdvajanje optičkih izomera iz racemskih smeša poklapaju sa važnim radovima vezanim za enzimsku katalizu u organskim rastvaračima 80-tih godina prošlog veka [68].

Primena lipaze u stereoselektivnim biotransformacijama može da se podeli u dve osnovne grupe: kinetičku rezoluciju racemskih smeša i enantioselektivnu enzimsku desimetrizaciju prohiralnih ili *mezo* jedinjenja [72]. Holandska kompanija DSM-Andeno je razvila tehnologiju za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-glicidilbutirata. Dobijeni (*R*)-estar glicidola i (*R*)-glicidol se koriste kao prekursori za sintezu (*R*) i (*S*)-glicidiltosilata, koji se primenjuju u sintezi optički aktivnih  $\beta$ -blokatora [38].

Austrijska kompaniji Chemie Linz Co. izvodi razdvajanje racemskih smeša 2-halopropionskih kiselina koristeći licencu Instituta za Tehnologiju iz Masačusetsa. Kiseline predstavljaju polazno jedinjenje u sintezi fenoksipropionskih herbicida. Proces

se zasniva na stereoselektivnom esterifikovanju (*S*)-izomera butanolom sa lipazom iz svinjskog pankreasa kao katalizatorom u anhidrovanom heksanu. Velik značaj imaju (*R*)- i (*S*)- izomeri  $\alpha$ -fenoksipropionskih kiselina jer predstavljaju prekursore za sintezu herbicida i nesteroidnih antiinflamatornih lekova ibuprofena i naproksena [38].

*S. marcescens* lipaza se koristi u asimetričnoj hidrolizi estra 3-fenilglicidne kiseline, koji je ključni prekursor u sintezi diltiazem hidrohlorida, kardio-vaskularnog leka [71].

BASF proces za proizvodnju hiralnih amina se takođe može izvoditi na industrijskom nivou. U ovom procesu imobilisana *Burkholderia* lipaza ili lipaza B iz *C. antarctica* vrši acilovanje jednog enantiomera racemske smeše amina sa alkil metoksiacetatom. Na ovaj način se mogu dobiti i drugi amini koji čine hiralne gradivne blokovi različitih lekova [35].

Lipaza iz *Pseudomonas AK* se koristi u sintezi hiralnog intermedijara u sintezi epotilona A, potencijalnog antitumorskog leka [69].

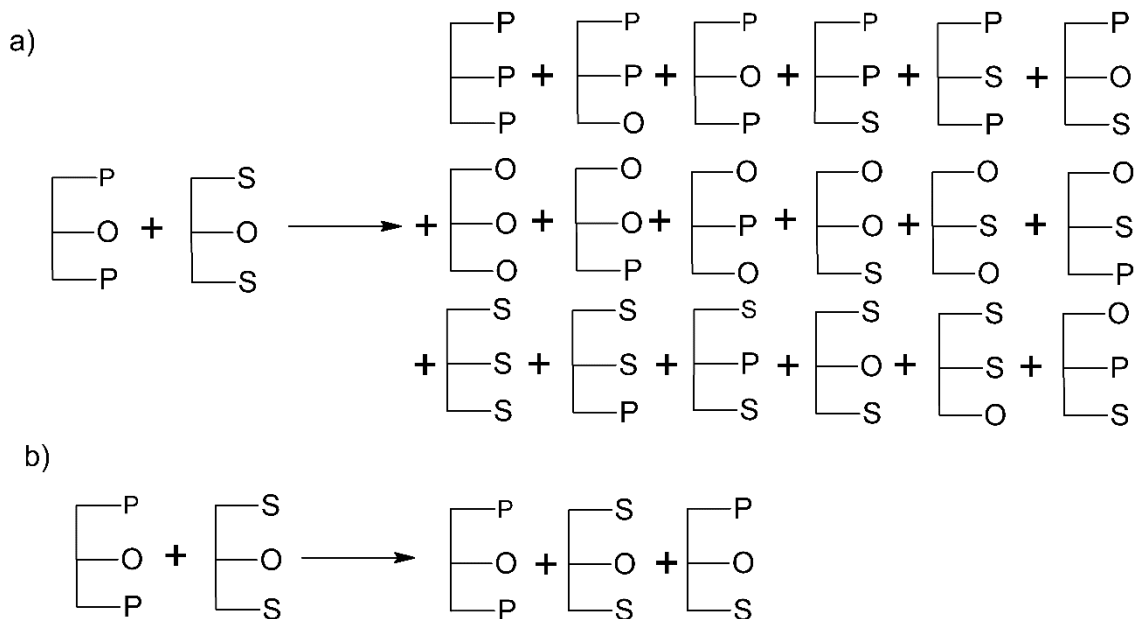
Nivo lipaze u krvi može da se koristi u dijagnostičke svrhe koje ukazuju na oštećenja pankreasa. Lipaze biljnog porekla se koriste i kao preparati za pomoć u varenju [38].

### **2.3.4.3 Primena lipaze u prehrambenoj industriji**

Primena lipaze u prehrambenoj industriji povezana je već duže vreme sa modifikovanjem arome pojedinih namirnica (tabela 2.2-2.3). Međutim, lipaza se sve više koristi u proizvodnji zdrave hrane, a porasla je i upotreba ovog enzima u pekarskoj industriji [68]. Naime, lipaza se sve češće koristi u pekarstvu, i to za poboljšanje arome proizvoda, ali i njegove mekoće i teksture. Millbo kompanija iz Italije proizvodi lipazu M300LF koja je efikasna u zameni emulgatora, povećava volumen hleba i drugih pekarskih proizvoda [38]. Pored toga, lipaze se koristi prilikom obrade mesa i ribe, voća i piva [73].

Takođe, koriste se u industriji masti i ulja, gde se zahvaljujući činjenici da katalizuju reakcije esterifikacije, interesterifikacije i transesterifikacije dobijaju proizvodi sa dodatom vrednošću modifikacijom jeftinih ulja. Enzimaska interesterifikacija masti i ulja, omogućava lakšu kontrolu finalnog proizvoda, jer se dobijaju proizvodi bez *trans* masti koji se povezuju sa većim rizikom od dobijanja srčanih bolesti. Hemijski katalizovanim hidrogenovanjem je takođe moguće dobiti masti i ulja željenih fizičkih karakteristika, ali ovi proizvodi sadrže veliku količinu *trans* masti pa se stoga mnogi proizvođači okreću

enzimskoj sintezi. Kada se interesterifikacija mešavine triglicerida izvodi enzimski, u zavisnosti od specifičnosti primenjene lipaze zavisi profil nastalih triglicerida. Ukoliko se interesterifikacija vrši sa nespecifičnim lipazama, poput lipaza iz *C. antarctica* i *C. cylindraceae* dolazi do zamene acil grupa na *sn*-1, *sn*-2 i *sn*-3 položajima, pa tako profil nastalih triglicerida liči na hemijski katalizovanu interesterifikaciju (slika 2.21). S druge strane, ako se interesterifikacija vrši sa nekom od *sn*-1,3 specifičnih lipaza, kao što su *R. miehei* i *T. lanuginosus*, acil grupa u *sn*-2 položaju ostaje netaknuta zbog sternih smetnji [4].



Slika 2.21. a) Proizvodi dobijeni transesterifikacijom dva triglicerida nespecifičnom lipazom ili hemijskim putem; b) Proizvodi transesterifikacije dobijeni sa 1,3-specifičnom lipazom [68].

Jedan od primera je proizvodnja kakao buter ekvivalenta iz palminog ulja, koju je komercijalizovao Quest-Lords Croklaan, a zasniva se na reakciji interesterifikacije katalizovane imobilisanom lipazom iz *R. miehei* [68]. S druge strane, Fuji Oil Company je takođe razvio proces dobijanja kako buter ekvivalenta iz palminog ulja i etil-stearata koristeći lipazu iz *R. niveus* imobilisanu na dijatomejsku zemlju [4]. Archer Daniel Midland je 2002 godine komercijalizovao proizvodnju margarina bez trans masti koristeći Lipozyme TL IM [4]. Isti enzim u reakcijama interesterifikacije mešavine ulja koristi De Smet Interenzym proces koji je alternativa hemijskoj interesterifikaciji i hidrogenovanju. U ovom procesu se pretretirana mešavina ulja upumpava u reaktor sa pakovanim slojem koji je na red povezan sa još barem dva ista reaktora. Sa 1 kg



imobilisanog enzima uspešno se izvrši interesterifikacija 2,5-4 t ulja, dok enzim ostaje aktivan između 2500-4000 h. Procenjeno je da cena enzima u ovom procesu iznosi 25 \$/t ulja pa se tako ukupni troškovi enzimskog i hemijskog procesa interesterifikacije gotovi jednaki [4]. Pomenuti proces se od 2009. godine primenjuje u Alimentos Polar Comercial iz Venecuele, a od 2011. i u Industrias ALES u Ekvadoru [4].

Proces enzimske interesterifikacije je komercijalizovao i IOI-Loders Croklaan za proizvodnju Betapola<sup>®</sup>, mešavinu biljnih masti koja se koristi kao zamena za majčino mleko kod odojčadi [4]. Ovaj proizvod je dobijen tretiranjem tripalmitina i nezasićenih masnih kiselina sa lipazom koja ima *sn*-1,3 specifičnost kako bi se dobio proizvod sličan humanom mleku. Kako masti u humanom mleku predstavljaju glavni izvor energije, a služe i kao građivni konstituenti za izgradnju ćelijskih membrana, jako je bitno da formula ima sličan sastav. Najzastupljeniji triglicerid u humanom mleku je triglicerid koji u *sn*-2 položaju sadrži zasićene masne kiseline, pre svega palmitinsku, a na pozicijama *sn*-1,3 sadrži nezasićene masne kiseline. Položaj palmitinske kiseline je od izuzetnog značaja, jer je kod odojčadi koja se hrane formulom uočena veća koncentracija palmitinske kiseline u krvi, iako je formula imala istu koncentraciju palmitinske kiseline kao mleko, ali ne u *sn*-2 položaju. Razlog je *sn*-1,3 specifičnost pankreasne lipaze koja prilikom hidrolize humanog mleka proizvodi 2-monopalmitin koji se lakše adsorbuje od slobodne palmitinske kiseline, koja sa jonima kalcijuma formira nerastvorne sapune koji dovode do zatvora kod beba [37]. Lipozyme<sup>®</sup> RM IM je korišćen za sintezu supstituenata masti iz humanog mleka koristeći mešavinu maslaca, sojinog ulja i ulja iz uljane repice. Dobijeni proizvod nije pokazao zadovoljavajuću oksidativnu stabilnost [4]. Koristeći isti enzim izvedena je interesterifikacija tripalmitina i mešavine biljnih ulja, kokosovog, sojinog i ulja šafranike, kako bi se dobio supstituent za masti iz humanog mleka i koji se dodaje u obrano kozije mleko i koristi kao formula kod beba koje imaju alergiju na kravlje mleko [4].

U industriji mleka, lipaze se koriste za hidrolizu mlečne masti. Trenutna primena uključuje poboljšanje organoleptičkih svojstava sireva, ubrzanje zrenja sira, proizvodnju preparata sličnih siru i lipolizu mlečne masti i pavlake. Dodatkom lipaze, prvo se oslobađaju masne kiseline kratkog lanca (C4 i C6) što dovodi do razvijanja oštrog ukusa, a oslobađanjem masnih kiselina srednje dužine lanca (C12 i C14) sirevi dobijaju odgovarajuću teksturu. Oslobodene masne kiseline dalje imaju ulogu u stvaranju drugih

aromatičnih jedinjenja, kao što su:  $\beta$ -ketokiseline, metil ketoni, različiti estri, i laktoni [38].

*Tabela 2.2. Pregled upotrebe lipaze u prehrambenoj industriji [48].*

Deo prehrambene industrije	Dejstvo	Proizvod
Mlečni proizvodi	Hidroliza mleka, zrenje sira i modifikacija putera	Sredstvo za korigovanje ukusa sira, putera i mleka
Pekarski proizvodi	Modifikacija ukusa	Duži rok trajanja
Piće	Modifikacija arome	Alkoholna pića, npr. vino i sake
Preliv za hranu	Poboljšanje kvaliteta	Majonez, šlag
Zdrava hrana	Transesterifikacija	Zdrava hrana
Meso i riba	Poboljšanje ukusa	Uklanjanje masti sa mesa i ribe
Masti i ulja	Transesterifikacija, hidroliza	Kokosov buter, margarin,

#### **2.3.4.4 Upotreba lipaze u sintezi biodizela**

Upotreba lipaze u proizvodnji biodizela, dobija sve više na značaju poslednjih godina, s obzirom da sve veća svest o klimatskim promenama dovodi do potrebe za iznalaženjem novih izvora energije iz obnovljivih izvora. Međutim, enzimska proizvodnja biodizela na industrijskom nivou još uvek nije dovoljno eksploatisana, a kao glavni razlog treba navesti cenu biokatalizatora. Naime, procenjena cena Novozyme 435, preparata lipaze koji se najčešće koristi u sintezi biodizela, i NaOH koji se koristi u klasičnoj bazno katalizovanoj transesterifikaciju su 0,14 i 0,006 \$ po kg dobijenog estera respektivno [68].

#### **2.3.4.5 Upotreba lipaze u kozmetičkoj industriji**

Sve veća svest potrošača o zaštiti životne sredine, održivom razvoju i značaju prirodnih preparata bez hemijskih dodataka, dovodi do potrebe za zamenom hemijski

sintetisanih komponenata kozmetičkih proizvoda, a samim tim imperativ ove industrije postaje razvoj alternativnih puteva za sintezu komponenata kozmetičkih preparata. Lipaze su najviše korišćeni enzimi u ovoj grani industrije [74]. Primena lipaza u kozmetičkoj industriji može se posmatrati sa dva aspekta, budući da lipaza može da se koristi kao katalizator za dobijanje specifičnih jedinjenja, ali takođe može da se nađe i kao aktivna komponenta u nekim proizvodima [75]. Aktivne lipaze se nalaze u proizvodima za površinsko čišćenje, gde služe za uklanjanje prljavštine i piling kože, kao i u preparatima za razgradnju masti, gde su često u kombinaciji sa proteazama. Kao primer se može navesti "Facial Cleanser" od Juju Cosmetics [75]. Takođe se koriste u preparatima za čišćenje nosa, negu kose, preparatima za šminkanje i ulepšavanje. Pored toga, lipaza se dodaje u kozmetički proizvod zbog "in situ" oslobađanja aktivne komponente iz neaktivnog prekursora.

S druge strane, primena lipaze kao katalizatora za dobijanje jedinjenja koja se koriste u kozmetičkim preparatima ima veliki potencijal, s obzirom da je veliki broj tih komponenata dobijen iz ulja i karboksilnih kiselina. Posredstvom lipaze mogu da se sintetišu estri viših masnih kiselina i viših masnih alkohola, koji se u novije vreme sve više koriste kao emolijenti, jer za razliku od mineralnih ulja ova jedinjenja sprečavaju dehidraciju kože, čineći je mekom i elastičnom [75]. Ovakvi estri se već komercijalno proizvode enzimskim putem, a prva kompanija koja je plasirala ovakav proizvod na tržište bila je Evonik Industries AG [74, 75]. Danas ova kompanija komercijalno proizvodi biotehnoškim putem niz emolijentnih estara poput izoamil-kokoata, miristol-miristata, decil-kokoata itd. [74, 75]. Pored estara koji se koriste kao emolijenti, estri triglicerida i masnih kiselina kraćeg lanca, koriste se kao osnova emulzija u kozmetičkim proizvodima. U novije vreme sve više pažnje se poklanja sintezi amfifilnih estara, koji će istovremeno služiti kao emulgatori i kao antimikrobni agensi. U zavisnosti od dužine i zasićenosti masne kiseline i vrste hidrofilne glave zavisi da li će se estar koristiti za stabilizaciju emulzije voda/ulje (V/U) ili ulje/voda (U/V). Veličina koja definiše ponašanje primenjenog emulgatora naziva se HLB broj (*na engl.* Hydrophile-Lipophile Balance) i predstavlja odnos lipofilnog i hidrofilnog dela u molekulu. Emulgatori koji imaju nisku HLB vrednost (3-8), su lipofilni, tj. pogodni su za pravljenje emulzija tipa V/U. S druge strane, emulgatori visokih HLB (8-18) vrednosti, koriste se za formiranje emulzija tipa U/V. Kada je reč o primeni lipaza u kozmetičkim preparatima ne treba

zaboraviti ni tzv. aroma estre, koje čine niže masne kiseline i monohidroksilni alkohol (metanol-heksanol, geraniol, citronelol). Upotrebom *B. cepacia* lipaze, moguće je dobiti optički čist (-)- mentol estar u reakciji transesterifikacije racemske smeše mentola, koji se koristi kao parfemski konstituent [69]. Lipaza P (Amano) se koristi za dobijanje hiralnog prekursora u sintezi mirisnog estra metil-jasmonata, koji se takođe koristi u industriji parfema [69].

Tabela 2.3. Pregled industrijske upotrebe komercijalnih preparata lipaze i njihovi proizvođači [8, 51, 52].

Izor lipaze	Upotreba	Komercijalni naziv	Proizvođač
<i>C. cylindracea</i>	Obrada hrane	ChiroCLEC-CR	Atlas Biologics
		Lipase AY	Amano
		Lipase MY, Lipase OF-360	Meito Sangyo
		Chirazyme® L-3	Boehringer Mannheim
		Lipomod™ 34P-L034P	Biocatalysts
<i>C. rugosa</i>	Organska sinteza	Lipase AY “Amano” 30 Resinase®	Amano Novozymes
<i>R. miehei</i>	Obrada hrane	Palatase®	Novozymes
<i>T. lanuginose</i>	Aditiv u detergentima	Lipolase®, Lipolase® Ultra, Lipo Prime™, Lipex®	Novozymes
<i>A. niger</i>	Obrada hrane	Lipase A “Amano” 6	Amano
		Lypolyve AN	Lyven
<i>R. oryzae</i>	Obrada hrane	Lipase F-AP15	Amano
	Industrija masti i ulja	Lipomod™ 627P-L627P	Biocatalysts
<i>R. niveus</i>	Industrija masti i ulja	Newlase F	Amano
<i>M. miehei</i>	Obrada hrane	Piccnate	Gist-Brocades
<i>M. javanicus</i>	Obrada hrane	Lipase M “Amano” 10	Amano
	Industrija masti i ulja		
<i>Penicillium roquefortii</i>	Obrada hrane	Lipomod™ 338P-L338P	Biocatalysts
<i>P. camemberti</i>	Obrada hrane	Lipase G “Amano” 50	Amano
	Industrija masti i ulja		
<i>Penicillium sp.</i>	Obrada hrane	Lipomod™ 621P-L621	Biocatalysts
<i>C. antarctica A/B</i>	Organska sinteza	Chirazyme®L-5	Boehringer Mannheim
		Chirazyme®L-2	
		SP 525 ili Novozym 435b	Nova Nordisk
<i>G. candidum</i>	Industrija masti i ulja	Chirazyme®L-8	Boehringer Mannheim
		SP 524, Lipolase®	Nova Nordisk

Novi trend je primena lipaze za povećanje rastvorljivosti prirodnih antioksidanasa, poput vitamina C i fenolnih kiselina, čija je funkcija hvatanje slobodnih radikala, a glavna prepreka za njihovu primenu slaba rastvorljivost u uljanim formulacijama. Esterifikacijom ovih jedinjenja sa alkoholima ili kiselinama dugog bočnog niza, povećava se njihova rastvorljivost u nepolarnim sredinama, a samim tim i njihova primena u kozmetičkim proizvodima. Esterifikacija ovih biološki aktivnih jedinjenja može da ima više benefita, jer se pokazalo da se antioksidativna svojstva ovih jedinjenja mogu i povećati uvođenjem bočnog niza. Pored toga estri fenolnih kiselina, poput ferulne kiseline, koriste se kao UV filteri u sredstvima za zaštitu od sunca, za šta je neophodna njihova lipofilizacija.

## 2.4 Sinteza estara

Tradicionalno, estri su se ekstrahovali iz biljnih materijala, međutim, ovaj način dobijanja estara zavisio je od sezonskih, klimatskih i geografskih faktora i najčešće nije davao proizvode zadovoljavajućeg stepena čistoće, što je zahtevalo razdvajanje estara od primesa, koje može biti veoma komplikovano. Iako je postupak dobijanja estara na ovaj način skup i stvara značajne probleme, usled velike količine otpadnog materijala, biljke su još uvek osnovni izvor za neke od njih.

Proizvodnja estara na industrijskom nivou se u najvećoj meri zasniva na hemijskom postupku katalizovanom jakim kiselinama. Ovakav način sinteze ima niz nedostataka, kao najznačajnije treba izdvojiti sledeće:

1. nespecifičnost sinteze, nastalu kao posledica nespecifičnosti kiselina kao katalizatora, a kao rezultat dobijaju se neželjeni sporedni proizvodi koji uzrokuju dodatne troškove prečišćavanja estara;
2. sporedni proizvodi su često toksični za prirodnu sredinu, pa se stvara problem njihovog odlaganja;
3. koncentrovane kiseline koje se koriste kao katalizatori otežavaju realizaciju postupka, jer mogu izazvati dehidraciju alkohola;
4. korozivno dejstvo kiselina povećava troškove proizvodnje jer zahteva upotrebu skupe opreme otporne na kiseline.

Nedostatke obe metode moguće je prevazići primenom enzimske sinteze estara. Ona podrazumeva dobijanje estara enzimski katalizovanom reakcijom u nevodnim sistemima sa ili bez organskog rastvarača, što dobijene proizvode svrstava u klasu prirodnih proizvoda većeg kvaliteta. Enzimska sinteza estara poseduje niz prednosti u odnosu na klasične hemijske metode kao što su:

1. blagi reakcioni uslovi (niže temperature, umerene vrednosti pH sredine),
2. visoka specifičnost enzimskih katalizatora u odnosu na hemijske- dobijanje optički čistih proizvoda bez potrebe za dodatnim prečišćavanjem reakcione smeše,
3. dobijanje čistih proizvoda bez primesa drugih jedinjenja čije nastajanje uvek prati hemijske postupke [3].

#### **2.4.1 Sinteza estara fenolnih kiselina**

Ideja o enzimskoj sintezi estara fenolnih kiselina započinje sa radom Gijota i saradnika, koji su u svom radu pokazali da je to moguće, i to sa veoma velikom razlikom u ostvarenim prinosima (2-98%) [76]. Ovo istraživanje otvorilo je niz pitanja vezanih za optimizaciju sinteze estara fenolnih kiselina, a koja su i dalje tema velikog broja naučnih radova. Naime, bez obzira na veliki potencijal ovih jedinjenja kao prirodnih aditiva hrane i kozmetičkih proizvoda, da bi enzimska sinteza estara fenolnih kiselina postala ekonomski prihvatljiva na industrijskom nivou proces mora da bude efikasan i isplativ. Pronalaženje adekvatnog enzimskog preparata predstavlja jedan od glavnih izazova prilikom optimizacije procesa, jer je često cena biokatalizatora osnovna prepreka za uvećanje obima proizvodnje iznad laboratorijskog nivoa.

##### **2.4.1.1 Izbor enzima**

Iako je u sintezi estara fenolnih kiselina do sada ispitan veliki broj enzima poput: fosfolipaze A [77], kutinaze [78], esteraze [79-81], tanaze [82],  $\alpha$ -himopripsina [83] i lipaza iz različitih izvora [78, 83, 84], komercijalni imobilisani preparati Novozyme 435 [85-88], Lipozyme RM IM [32, 85, 86, 88] i Lipozyme TL IM [32, 33, 77] se koriste gotovo isključivo. Primena imobilisanih preparata je opravdana sa ekonomskog aspekta, jer omogućava ponovnu upotrebu enzima i olakšava separaciju finalnog proizvoda, a u sintezi estara je poželjna, jer višak vode u reakcionoj smeši favorizuje suprotnu reakciju

hidrolize. Razlike u efikasnosti ovih preparata potiču od različitog afiniteta enzima prema supstratima sa kojima reaguju, ali i prirode nosača na koji je enzim imobilisan, kao i sadržaj vode u imobilisanom preparatu [77]. Sumiranjem literaturnih podataka (tabela 2.4) može se zaključiti da se Novozyme 435 pokazao kao superioran biokatalizator u gotovo svakoj reakciji lipofilizacije fenolnih kiselina [32, 33, 85, 86].

U reakciji transesterifikacije 3,4-dihidroksifenilsirćetne kiseline i dihidrokafene kiseline sa uljem račića u sistemu bez rastvarača, pokazalo se da je efikasnost Lipozyme TL IM slična kao Novozyme 435, međutim ponovljivost eksperimenta je znatno niža u slučaju Lipozyme TL IM, pa je Novozyme 435 i u ovoj reakciji izabran kao pogodan biokatalizator. Veliku oscilaciju u ostvarenim prinosima sa Lipozyme TL IM autori pripisuju neuniformnoj raspodeli čestica koja može da dovede do promenjenih interakcija između enzima i supstrata na granici faza [33]. Katsoura i saradnici su ispitali sva tri pomenuta komercijalna preparata imobilisane lipaze uz Lipolase 100T prilikom sinteze fenolnih estara u 1-butil-3-metilimidazolium heksafluoroboratu ([bmim]BF<sub>6</sub>). Pokazalo se da je sinteza moguća jedino sa Lipozyme RL IM i Novozyme 435, dok je njihova efikasnost bila različita i zavisila je od strukture fenolnog supstrata. Derivati cimetine kiseline su esterifikovani sa *n*-oktanolom u višem prinosu (%) koristeći Lipozyme RL IM, dok je Novozyme 435 pokazao veći afinitet prema *p*-hidroksifenilsirćetnoj i propionskoj kiselini [88].

Tabela 2.4. Reakcioni uslovi sinteze različitih fenolnih estara.

Lipaza	Acil donor	Acil akceptor	Reakcioni medijum	Reakcioni uslovi	Prinos	Ref.
Novozyme 435 Lipozyme RM IM Lipozyme TL IM "Amano" 6 Pankreasna lipaza	Ferulna kiselina Etil-ferulat	Ricinusovo ulje Monostearin Monoolein	Bez rastvarača	Molski odnos 1:1 Količina enzima 20% w/w 73 °C 23h/90 °C 72h Vakum 10 mm Hg	~100 % Lipofilni i hidrofilni ferulovani lipidi 62.6% i 37.3%, 98.3 % konverzija etil-ferulata	[32, 89]
Novozyme 435	Kafena kiselina	( <i>R,S</i> )-2-pentanol, ( <i>R,S</i> )-2-heptanol ( <i>R,S</i> )-2-oktanol	Anhidrovani oktani	20 mmol/dm <sup>3</sup> kafena kiselina 420 mmol/dm <sup>3</sup> hiralni alkohol 50,8 mg lipaze 0,5 ml rastvarača 67°C, 52 h	33,8 ± 1,8 % E vrednost >100 za ( <i>R</i> )-1-metilbutil-kafeat	[90]
Novozyme 435	Cimetna kiselina, Dihidrokafeena kiselina, 3,4-dihidroksifenil sirćetna kiselina, 3,4-dimetoksi benzoeva kiselina, ferulna kiselina sinapinska kiselina	Laneno ulje	Bez rastvarača	10-60 mmmol/dm <sup>3</sup> acil donor 40-50 mg lipaze 150 o/min 55°C, a <sub>w</sub> 0,38, 7 dana	48,6 – 86,5%	[85, 87]
Novozyme 435 Lipozyme RM IM	Dihidrokafeena kiselina Ferulna kiselina	Linoleil alkohol Linolenil alkohol	heksan/2-butanon 75:25 (v/v)	10 mmmol/dm <sup>3</sup> dihidrokafeena kiselina 80 mmmol/dm <sup>3</sup> alkohol 9 cm <sup>3</sup> rastvarača 25 mg lipaze 150 o/min 55 °C 7 dana	~100 % (57% za Lipozyme RM IM u heksan/ <i>tert</i> -butanol sa linoleil alkoholom) (16% ferulna kiselina i linolenil alkohol)	[86, 91]



Novozyme 435	Cimetna kiselina, kafena kiselina, <i>p</i> -kumarinska kiselina 3,4-dihidroksifenil sirćetna kiselina, etil-ferulat, ferulna kiselina Sinapinska kiselina 3,4-dihroksibenzoeva kiselina 3,4-dimetoksicimetna kiselina	Laneno ulje	heksan/2-butanon 85:15 (v/v)	5 mmmol/dm <sup>3</sup> kiseline 40 mmmol/dm <sup>3</sup> lanenog ulja 30 mg lipaze 10 cm <sup>3</sup> smeša rastvarača 9-10 dana 2.2 mg/ml silika gela 150 o/min 55 °C	73,9% za cimetnu kiselinu 11,3% za kafenu kiselinu 60% za <i>p</i> -kumarinsku kiselinu 8,7-68,9%	[92]
Novozyme 435	metil- <i>p</i> -kumarat metil-ferulat	1-oktanol	Holin-hlorid (ChCl) sa ureom (U)(ChCl:U)	40 mmmol/dm <sup>3</sup> metil estra 240 mmmol/dm <sup>3</sup> 1-oktanol 50 mg lipaze 5 cm <sup>3</sup> rastvarača 200 o/min 60 °C, azot atm a <sub>w</sub> 0.15 72 h	~100%	[93]
Novozyme 435 Lipozyme TL IM	3,4-dihidroksifenil sirćetna kiselina Dihidrokafeina kiselina	Ulje račića	Bez rastvarača	20 mmmol/dm <sup>3</sup> 3,4-dihidroksifenil sirćetna kiselina 2 cm <sup>3</sup> reakcione smeše 154 o/min 60 °C 48 h 62 mg/cm <sup>3</sup> Novozyme 435	75% za 3,4-dihidroksifenil sirćetnu kiselinu i Novozyme 435	[33]
fosfolipaza A Novozyme 435 Lipozyme TL IM Lipozyme RM IM	Etil-ferulat	Fosfatidilholin iz soje	toluen/hloroform 90:10 (v/v)	1:5 molarni odnos supstrata (etil-ferulat:fosfatidilholin) 5 cm <sup>3</sup> rastvarača 60 mg/cm <sup>3</sup> lipaze 100 mg/cm <sup>3</sup> molekulska sita 55°C 200 o/min, 4 dana	40,5% (hidroliza fosfatidilholina u toku 1,5 h)	[77]
Novozyme 435	Dihidrokafeina kiselina Ferulna kiselina Kafena kiselina	1-oktanol	tOMA.TFA	0,4 mmol/dm <sup>3</sup> acil donor 1:38 molarni odnos supstrata (dihidrokafeina kiselina:1-oktanol) 1-oktanol/tOMA.TFA 12:1 (v/v) 0,5 cm <sup>3</sup> tOMA.TFA 100 mg lipaze 100 mg molekulskih sita 70 °C 300 o/min, 5 dana	86 % 212 mmmol/dm <sup>3</sup> /g/h za dihidrokafeinu kiselinu koncentracija 1,6 M ferulna kiselina 86 % posle 16 dana kafena kiselina 60 % posle 12 dana	[94]

Novozyme 435	Ferulna kiselina	Laneno ulje	natkritični CO <sub>2</sub>	2 g supstrata 1:6 molarni odnos supstrata (ferulna kiselina:laneno ulje) 15 % (w/w) lipaze 80 °C 215 bar 27,5 h	57,6%	[95]
Novozyme 435 Lipozyme RM IM	3,4-dihidroksifenil sirćetna kiselina	Riblje jetreno ulje	heksan/2-butanone smeša 75:25 (v/v)	5 mmmol/dm <sup>3</sup> acil donor 20 mmmol/dm <sup>3</sup> acil akceptor 30 mg lipaze 9 cm <sup>3</sup> smeše rastvarača 150 o/min 55 °C 8 dana	83% 15 % sa Lipozyme RM IM	[96]
Novozyme 435	Kafena kiselina	2-fenil-etanol	izooktan	1 mmmol/dm <sup>3</sup> kafena kiselina 1:71 molski odnos supstrata (kafena kiselina:2-fenil-etanol) 293,8 mg lipaze 70°C 9,6 h 2 W/cm <sup>2</sup>	93%	[97]
Novozyme 435 Lipozyme TL IM Lipozyme RM IM Lipolase 100T	Cimetna kiselina kumarna kiselina, kafena kiselina, <i>p</i> -hidroksifenil sirćetna kiselina <i>p</i> -hidroksifenil propionska kiselina 2,4-dihidroksihidro cimetna kiselina, 3,4-dihidroksihidro cimetna kiselina	metanol etanol propanol butanol heksanol geraniol oktanol	[emim]BF4 [omim]BF4 [bmim]BF4 [emim]PF6 [bmim]PF6 [omim]PF6	20 mmmol/dm <sup>3</sup> fenolna kiselina 20-250 mmmol/dm <sup>3</sup> alifatični alkohol 80 mg/cm <sup>3</sup> lipaze 50-60 °C 250 o/min	0,4-55,6% za Novozyme 435 4,9-59,2 % za Lipozyme RM IM	[88]

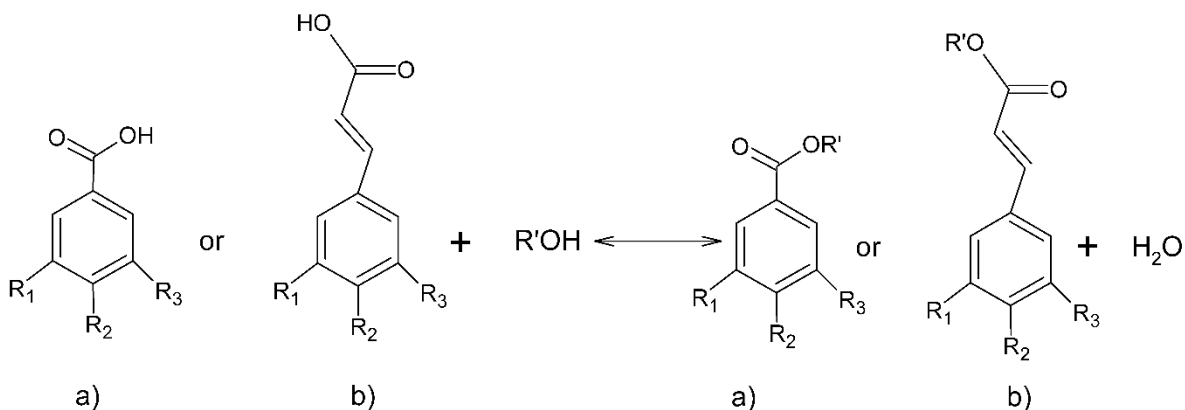
Međutim, prilikom ispitivanja operativne stabilnosti upotrebljenih enzima, pokazalo se da je Novozyme 435 zadržao istu aktivnost tokom sedam ciklusa, dok je aktivnost Lipozyme RL IM pala za 50% nakon četiri ciklusa [88]. Slično, Stamatis i saradnici su pokazali da Lipozyme RL IM pokazuje veći afinitet od Novozyme 435 prema ferulnoj kiselini sa istim acil akceptorom, dok su s druge strane Kompton i saradnici objavili da je enzimska sinteza ovog estera moguća jedino ako se kao biokatalizator koristi Novozyme 435 [78, 83].

Fokus novih istraživanja u oblasti sinteze estara fenolnih kiselina, svakako je stavljen na pronalaženje novih biokatalizatora koji bi omogućili da cena procesa proizvodnje ovih jedinjenja bude niža. Rešenja se nalaze kako u pronalaženju novih biokatalizatora testiranjem enzima iz novih sojeva koji ranije nisu ispitivani u ovim reakcijama, kao i u modifikovanju postojećih enzima kako genetskim inženjerstvom, tako i povećanjem njihove aktivnosti imobilizacijom ili aktivacijom jonima [81, 98-101]. Tako su lipaza iz *R. oryzae* i *Y. lipolytica* uspešno korišćene u sintezi oktil-metoksicinamata i 2-feniletilacetata, respektivno [102, 103].

#### **2.4.1.2 Uticaj vrste acil donora na sintezu fenolnih estara**

Lipaze pokazuju promenljiv stepen selektivnosti prema supstratima sa kojima reaguju. Sterne smetnje (grananje, nezasićenost i dužina lanca) i elektronski efekti supstrata su dva glavna faktora koja određuju selektivnost. Uticaj navedenih faktora na esterifikaciju zavisi od tipa korišćene lipaze i enzimске specifičnosti. Prinos fenolnih estara u enzimski katalizovanoj sintezi zavisi u velikoj meri od strukture fenolne kiseline (slika 2.22), odnosno od prirode supstituenata i zasićenosti acil niza na aromatičnom prstenu. Dobro je dokumentovano da su prinosi u reakcijama esterifikacije katalizovanim lipazom B značajno niži ukoliko fenolna kiselina poseduju hidroksilnu ili metoksi grupu u *p*-položaju na aromatičnom prstenu [62, 74-76]. Autori ovaj inhibitorski efekat pomenutih supstituenata pripisuju kombinaciji elektronskog i sternog efekta. Naime, elektron donorske grupe na prstenu deaktiviraju elektrofilni ugljenikov atom karboksilne grupe za nukleofilni napad na alkohol, što rezultira slabijom reaktivnošću enzima [74, 77]. Ovaj fenomen uočili su još Gijot i saradnici, kada su tokom esterifikacije niza fenolnih kiselina sa *n*-butanolom, najviši prinos, 97%, ostvarili upravo sa nesupstituisanom cimetnom kiselinom [76]. Buisman i saradnici nedugo posle Gijota

dolaze do istih zaključaka [104], ističući još da prisustvo supstituenta na prstenu u blizini karboksilne grupe benzoeve kiseline i nefleksibilnost konjugovane *trans* dvostruke veze cimetine kiseline, doprinose slabijem vezivanju supstrata za aktivni centar enzima [104].



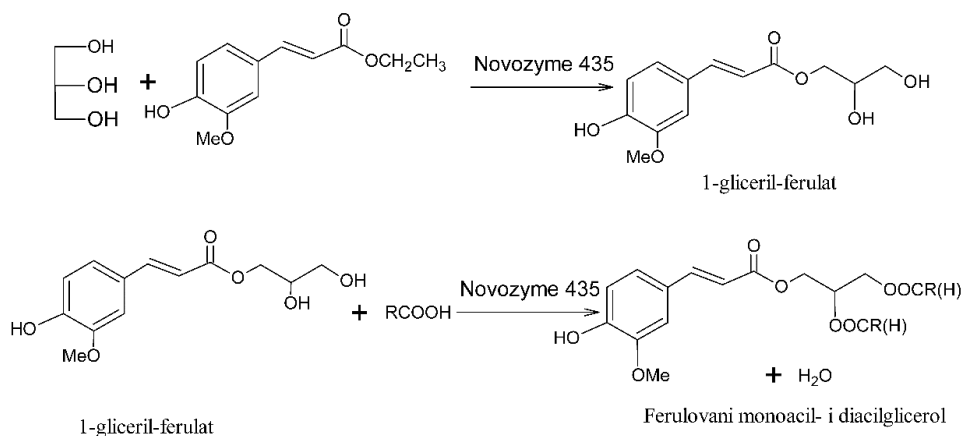
Fenolna kiselina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Fenolna kiselina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Benzoeva kiselina	H	H	H	Cimetna kiselina	H	H	H
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	H	OH	H	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	H	OH	H
Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	Kafena kiselina	H	OH	OH
Vanilinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ferulna kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Siringinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Sinapinska kiselina	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Galna kiselina	OH	OH	OH				

Slika 2.22. Esterifikacija derivata a) benzoeve; b) cimetine kiseline

Uočeno je da se stepen inhibicije značajno smanjuje sa zasićenjem dvostruke veze bočnog lanca konjugovanog sa aromatičnim prstenom, razotkrivajući tako dominantnu ulogu elektronskog efekta na inhibiciju enzima [85, 91, 92, 105]. Prisustvo dodatnih hidroksi ili metoksi grupa na prstenu ima slično inhibitorno dejstvo na aktivnost enzima, ali stepen inhibicije zavisi od reakcionih uslova kao i prirode acil akceptora [91]. Karboune i saradnici su pokazali da zamena jedne hidroksilne grupe kafene kiseline sa jednom ili dve metoksi grupe (ferulna i sinapinska kiselina) potencirana porast, dok zamena obe hidroksilne grupe sa metoksi grupama dovodi do pada prinosa u reakciji acidolize ulja lanenog semena [74]. Sličan trend zabeležen je u esterifikaciji fenolnih

kiselina sa feniletanolom, sa izuzetkom 3,4-dimetoksi cimetne kiseline s kojom je ostvaren dobar prinos [65, 75]. Nasuprot tome, esterifikacija kafene kiseline sa *n*-heksanolom, oktanolom i dodekanolom bila je efikasnija u poređenju sa ferulnom kiselinom [78]. Zapravo, inhibitorni uticaj metoksi grupe u mnogome zavisi od drugih supstituenata na aromatičnom prstenu. Niski prinosi estara 3,4-dihidroksi benzoeve kiseline mogu se pripisati njenoj krutoj koplanarnoj konformaciji, koja je posledica blizine supstituenata i karboksline grupe [76, 92]. Feruloil estaraza iz *Fusarium oxysporum*, s druge strane, pokazuje najveći afinitet prema *p*-hidroksilovanim derivatima cimetne kiseline, dok nema afinitet prema cimetnoj kiselini [79, 80].

U sintezi ferulnih lipida ricinusovog ulja, pokazalo se da je etil-ferulat bolji acil donor od same ferulne kiseline, jer poseduje nižu temperaturu topljenja pa je njegova rastvorljivost u ulju značajno bolja [89]. Reakcija je izvedena u vakuumu (10 mm Hg), jer se na taj način omogućava uklanjanje etanola koji nastaje kao sporedni proizvod, čime se favorizuje pomeranje ravnoteže ka stvaranju proizvoda, ali se i sprečava moguća inaktivacija enzima viškom etanola. Ispostavilo se da je korišćenje rotacionog vakuuma uparivača (150 o/min) efikasnije nego kada je vakuum ostvaren u sistemu sa mehaničkim mešanjem (300 o/min). Razlog je efikasnije odvođenje etanola iz sistema, kao i smanjenje spoljašnjeg otpora prenosu mase efikasnim mešanjem faza [106-108]. Ista grupa autora, bavi se i sintezom ferulnih derivata glicerola i oleinske kiseline u vakuumu koristeći etil-ferulat kao donor ferulne grupe u sistemima bez rastvarača i jonskim tečnostima [84, 107, 109, 110]. Autori su došli do zaključka da je mnogo efikasnije postupak izvoditi dvostepeno, pri čemu prvo nastaje 1-gliceril-ferulat, koji u sledećem stupnju reaguje sa oleinskom kiselinom i daje mono- i diacilferuloil glicerol (slika 2.23) [106].



Slika 2.23. Dvostepena enzimaska sinteza mono- i diacilglicerola [106]

Ovaj fenomen se može pripisati činjenici da je glicerol bolji acil akceptor od mono i diacilglicerola, jer poseduje više hidrokslnih grupa, a s druge strane etil-ferulat u reakciji transesterifikacije kao voluminozan supstrat pravi veće sterne smetnje nego alifatični acil donori, u ovom slučaju oleinska kiselina [106, 109]. Slično je pokazao Kompton u reakciji etil-ferulata i trioleina [83]. S druge strane prilikom sinteze ferulovanih derivata lanenog ulja izvedenoj na atmosferskom pritisku ferulna kiselina se pokazala kao bolji acil donor od etil-ferulata. Razlog je moguća pomenuta inaktivacija enzima etanolom, ali i moguća kompetitivna reakcija etanola i ferulne kiseline [92]. Ju i saradnici su problem nastanka etanola kao sporednog proizvoda u sintezi ferulovanih derivata trioleina prevazišli tako što su koristili vinil-ferulat kao acil donor. Naime, acetaldehid koji nastaje kao sporedni proizvod ove reakcije, ne učestvuje dalje u reakciji pa ne favorizuje pomeranje ravnoteže ka povratnoj reakciji [111].

#### **2.4.1.3 Uticaj vrste acil akceptora**

Lipaze pokazuju promenljiv stepen selektivnosti i prema acil akceptorima sa kojima reaguju, međutim kako je molekul alkohola nukleofil koji vrši deacilovanje acil-enzim, izbor alkohola manje zavisi od aktivnog centra. Izbor alkohola zavisi od oblasti koja okružuje aktivni centar enzima. Međutim, u slučaju CALB, kanal u kom se vezuje alkoholni supstrat je uži od kanala u kom se vezuje kiselina, pa ovaj enzim pokazuje veću selektivnost prema acil akceptorima [51]. Kako alkohol ne učestvuje u stvaranju acil enzim kompleksa, ukupna brzina reakcije određena je difuzijom molekula alkohola do aktivnog centra enzima. Katsoura i saradnici su pokazali da Novozyme 435 i Lipozyme RL IM pokazuju različitu specifičnost prema alifatičnim alkoholima i geraniolu u sintezi estara ferulne kiseline u jonskoj tečnosti [bmim]PF<sub>6</sub> [88]. Pokazalo se da početna brzina reakcije i prinos reakcije opadaju sa porastom dužine ugljenikov niza alkohola za Novozyme 435, i najniži prinos je ostvaren sa geraniolom. Kod Lipozyme RL IM je situacija nešto drugačija, naime prinos raste sa porastom broja C atoma alkohola do C<sub>4</sub>, nakon čega pada i ostaje približno isti za C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> i geraniol [88]. Iz dobijenih rezultata se vidi da je Novozyme 435 pokazuje mali afinitet prema razgranatom geraniolu, što je u skladu sa pomenutom diskusijinom o aktivnom centru ovog enzima. Uticaj vrste alkohola na prinos sinteze estara ferulne kiseline ispitan je i u heksanu i uočen je sličan trend, s tim što esterifikacija nije uspešno izvedena sa metanolom, a uspešno je izvedena sa

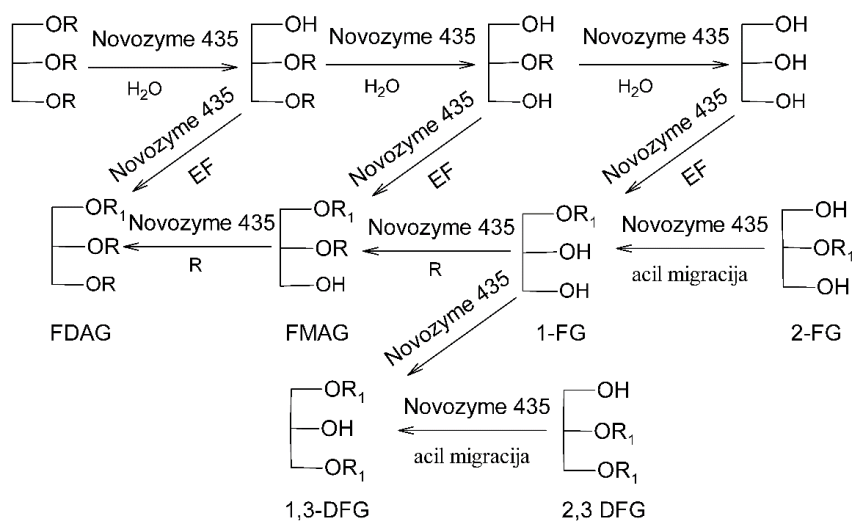
aromatičnim benzil alkoholom [112], a isti trend zadržan je i u sistemu rastvarača heksan/butanon (75/25) dok je u sistemu bez rastvarača esterifikacija bila moguća jedino sa alkoholima sa 8 i više C atoma [76].

U sintezi estara cimetne kiseline u *n*-heksanu, pokazalo se da dužina alifatičnog niza alkohola nema uticaj na prinos esterifikacije, a najniži prinosi ostvareni su sa aromatičnim benzil i cinamil alkoholom, dok je visok prinos ostvaren sa cikloheksil alkoholom [112]. Ovakav rezultat ukazuje na veći uticaj elektronskog efekta u odnosu na sterni i u vezivanju aromatičnih acil akceptora. U sistemu bez rastvarača, kao najbolji acil akceptori pokazali su se *n*-butanol i *n*-oktanol [76].

U reakciji transesterifikacije etil-ferulata i monostearina i monooleina, značajno viši prinosi ostvareni su sa monostearinom, najverovatnije zbog manjih sternih smetnji stearinske u odnosu na oleinsku kiselinu [32].

#### 2.4.1.4 Uticaj molskog odnosa supstrata

Tipično, sinteza lipofilnih fenola se sprovodi u višku acil akceptora, a molski odnosi acil donora i acil akceptora idu čak i do 1:100 [97]. Međutim, većina istraživanja izvedena je pri molskim odnosima do 1:10 [77, 92, 95, 105, 113, 114]. U reakciji sinteze derivata dihidrokafene kiseline i lanenog ulja, pokazalo se da je smanjenje molskog odnosa od 8 do 1 (ulje:kiseline) dovelo do povećanja enzimske aktivnosti 2,5 puta. Prisustvo veće količine ulja doprinosi većoj koncentraciji mono- i diacil glicerola, čime se termodinamička ravnoteža reakcije pomera ka stvaranju fenolnih lipida [113].



Slika 2.24. Enzimska sinteza fenolnih lipida na primeru ferulne kiseline [115].

Karbourne i saradnici su došli do istih zaključaka u sintezi različitih fenolnih derivata lanenog ulja, kada je povećanje molskog odnosa od 4 do 8 (n(acil akc.): n(acil don.)) dovelo do povećanja prinosa u opsegu od 5-60 do 7-74%, ali je stepen povećanja zavisio od strukture fenolne kiseline [92]. Prilikom acidolize ulja riblje jetre sa dihidroksifenilsirćetnom kiselinom, kao optimalni molski odnos pokazao se 4, kada je nakon 8 dana prinos reakcije iznosio 83%, dok je pri molskom odnosu od 8, prinos reakcije bio 52%. S druge strane Karbourne i saradnici sa istim supstratom i lanenim uljem u istom vremenskom periodu bolji prinos ostvarili pri molskom odnosu od 8 [92, 96]. Ovakav rezultat ukazuje na efekte polarnosti i viskoznosti reakcione smeše na raspodelu supstrata i njegovu dostupnost enzimu.

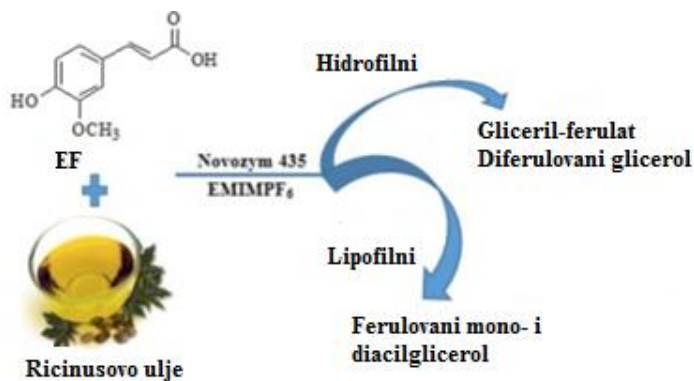
U reakciji transesterifikacije cimetine kiseline i trioleina (TO), pri nižim molskim odnosima, 1:3-1:4,5 (n(acil don.): n(acil akc.)) prinos reakcije ostvaren tokom prvih 5 dana značajno je viši u odnosu na prinos ostvaren pri molskom odnosu od 1:6, ali nakon toga stepen konverzije pri ovom molskom odnosu raste i prevazilazi prinos ostvaren pri nižim molskim odnosima. Ovakav trend ukazuje na inhibitorno dejstvo početnog viška TO, koji se sa napredovanjem reakcije smanjuje. Naime, inhibicija trioleinom najverovatnije potiče od velike viskoznosti reakcione smeše i promene polarnosti u mikrookolini enzima koja dovodi do limitacija u prenosu mase i/ili promene u raspodeli supstrata u reakcionoj smeši, a ne do deaktivacije enzima [116].

Višak linoleil alkohola u reakcionoj smeši pogodovao je sintezi linoleil-dihidrokafeata i najveći prinos je ostvaren pri najvećoj koncentraciji linoleil alkohola, tj. molskom odnosu od 1:8 [86]. Ipak, uticaj molskog odnosa supstrata u mnogome zavisi od primenjenog rastvarača, pa su Katsoura i saradnici pokazali da je najviši stepen konverzije u sintezi oktil-ferulata u jonskoj tečnosti [bmim]PF<sub>6</sub> dobijen pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata [88].

Variranjem molskog odnosa može se promeniti selektivnost enzima prema supstratu, jer se menja polarnost reakcionog medijuma a samim tim i dostupnost supstrata enzimu. U sintezi strukturnih lipida lanenog ulja i dihidrokafene kiseline, povećanje koncentracije ulja u reakcionoj smeši dovelo je do povećanja ukupnog prinosa reakcije (%), ali i favorizovanje nastanka fenolnih diacilglicerola u odnosu na monoacilglicerole (slika 2.24-2.25). Razlog je bolja rastvorljivost nepolarnih diacilglicerola u ulju, čime se povećava njihova koncentracija u mikrookolini enzima [113]. Slično, u reakciji sinteze



cinamoil-mono- i dioleilglicerola povećanjem koncentracije TO u reakcionoj smeši, menja se selektivnost reakcije i ravnoteža pomera ka nastanku lipofilnijih cinamoil-diacilglicerola [116].



Slika 2.25. Proizvodi sinteze fenolnih lipida na primeru ferulne kiseline i ricinusovog ulja [115].

#### 2.4.1.5 Uticaj temperature

Optimalne temperature za enzimsku sintezu estara fenolnih kiselina najčešće se nalaze u opsegu od 55-70 °C [33, 77, 85, 90, 93, 109]. Međutim, ukoliko se kao biokatalizator ne koristi termostabilna lipaza B, optimalna temperatura sinteze fenolnih estara može biti značajno niža, čak i samo 28°C [103, 117]. Prijavljene su i više temperature kao optimalne za sintezu fenolnih estara, pa su tako Sun i saradnici nedavno pokazali da je porast temperature od 60 do 90°C doveo do značajnog porasta u konverziji etil-ferulata u reakciji transesterifikacije sa ricinusovim uljem, pa je tako optimalna temperatura za ovu reakciju, katalizovanu sa Novozyme 435, čak 90°C [89]. Kao razlog ovako visoke optimalne temperature, autori navode olakšan transfer acil donora u reakcionoj smeši na višoj temperaturi usled smanjenog viskoziteta reakcione smeše [89]. Slično, usled olakšane difuzije reaktanata u natkritičnom ugljen-dioksidu na 80°C, na ovoj temperaturi su ostvareni najbolji prinosi u reakciji transesterifikacije etil-ferulata sa TO i lanenim uljem [95, 118]. Temperatura od 90°C optimalna je i za sintezu ferulovanih glicerola u jonskim tečnostima zahvaljujući zaštitnom efektu ovih jedinjenja protiv termičke deaktivacije, jer je optimalna temperatura za sintezu ovih jedinjenja u sistemu bez rastvarača 60°C [84, 106].

#### 2.4.1.6 Izbor reakcionog medijuma

Nedavni napredak u primeni biotransformacija zahteva korišćenje nevodene sredine zbog niza prednosti koje nadmašuju nedostatke izvođenja ovi reakcija u organskim rastvaračima. Pre svega poboljšane rastvorljivosti hidrofobnih supstrata, pomeranju termodinamičke ravnoteže ka sintezi, a ne prema hidrolizi, sporedne reakcije koje zahtevaju vodu se svode na minimum, smanjuje se ili u potpunosti isključuje mogućnost kontaminacije mikroorganizmima, menja se specifičnost enzima prema određenim supstratima, olakšano je odvajanje enzima i njegova ponovna upotreba, a moguće je postizanje bolje termostabilnosti enzima [119].

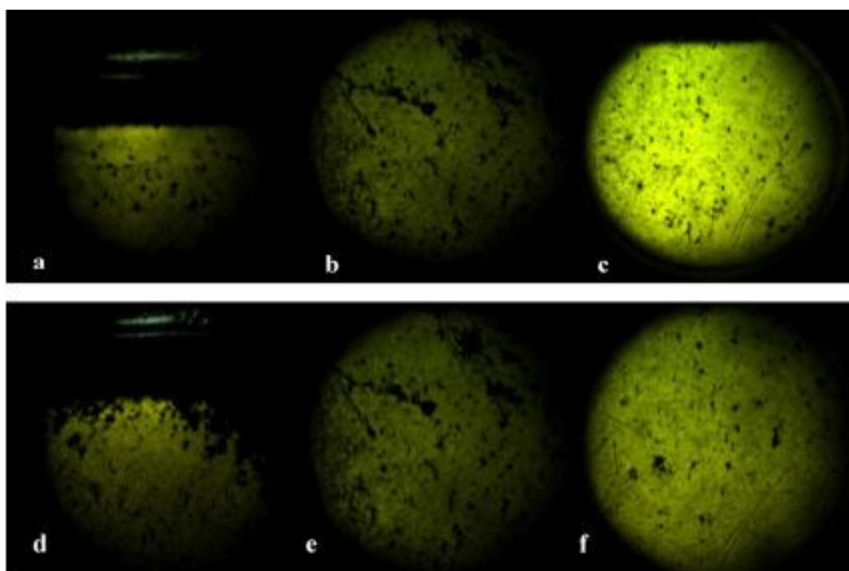
Generalno se organski rastvarači sa visokom  $\log P$  vrednošću smatraju dobrim reakcionim medijumima za izvođenje reakcija katalizovanim lipazama u nevodnim sredinama, jer ne utiču na mikrovodeni sloj neophodan za normalnu katalitičku aktivnost enzima [119]. Prema studiji koju su izveli Lane i saradnici, optimalni reakcioni medijumi za biotransformacije su rastvarači čija je  $\log P$  vrednost veća od 4 [120]. Međutim, u reakcijama sinteze fenolnih estara situacija je nešto drugačija usled veoma male rastvorljivosti fenolnih kiselina u nepolarnim sredinama. Tako je Kompton ustanovio da sinteza oktil-ferulata nije moguća u nepolarnom *n*-heksanu i toluenu, već je kao reakcioni medijum korišćen *tert*-butanol [83]. Jang i saradnici su sintezu ferulovanih derivata fosfatidilholina isprobali u više rastvarača umerene polarnosti sa opsegom  $\log P$  vrednosti od 0,37-3,5. Iako je rastvorljivost oba supstrata bolja u polarnim supstratima, zbog negativnog efekta ovih rastvarača na aktivnost enzima autori su se odlučili za rastvarače umerene polarnosti. Pokazalo se da je najbolji stepen konverzije ostvaren u toluenu ( $\log P=2,5$ ), pri čemu je prinos reakcije dalje povećan izvođenjem reakcije u smeši toluena i hloroforma [77]. Naime, kako bi se prevazišao problem male rastvorljivosti fenolnih kiselina nekad je neophodno reakciju sinteze fenolnih estara izvoditi u binarnim sistemima rastvarača kako bi se povećala rastvorljivost kiseline u reakcionom medijumu [77, 86, 92, 105, 114]. Sabali i saradnici su pokazali da su u sintezi linoleil-dihidrokafeata postignute veće početne aktivnosti reakcije esterifikacije u smeši heksan/*tert*-butanol nego u smeši heksan/2-butanon, međutim, u smeši heksan/2-butanon ostvaren je veći prinos reakcije pa je izabran kao optimalan, a kasnije je primenjen i u sintezi drugih fenolnih lipida (tabela 2.4) [86]. Utvrđeno je da odnos rastvarača u binarnom sistemu utiče na aktivnost, ali i na selektivnost primenjene lipaze [92, 113], pa je tako uočeno da

je sinteza fenolnih diacilglicerola favorizovana kada je veći udeo nepolarne faze u smeši rastvarača, što je posledica veće rastvorljivosti diacilglicerola u mikrookolini enzima [92, 96, 113].

Drugi način da se prevaziđe problem male rastvorljivosti fenolnih kiselina je izvođenje reakcije sinteze fenolnih estara u jonskim tečnostima, koje predstavljaju interesantan reakcioni medijum za enzimski katalizovane reakcije zbog svojih jedinstvenih fizičko-hemijskih karakteristika. Ova jonizovana jedinjenja koja su tečna na sobnoj temperaturi su odlični rastvarači, imaju veliku termostabilnost, odličnu jonsku provodljivost, nizak napon pare, i veoma nisku toksičnost, zbog čega se početak njihove primene naziva "zelenom" hemijskom revolucijom [88, 94, 119]. Zaštitni efekat jonskih tečnosti protiv toplotne deaktivacije enzima omogućio je rad na višim temperaturama u sintezi ferulovanih glicerola, pri čemu je optimalna temperatura reakcije iznosila 90°C, dok se prilikom izvođenja ove reakcije u sistemu bez rastvarača kao optimalna pokazala temperatura od 60 °C [81, 97]. Pregledom relevantnih literaturnih radova iz ove oblasti, dolazi se do zaključka da uticaj anjona jonske tečnosti ima veći uticaj na sintezu fenolnih estara od katjona, pri čemu se kao izuzetno dobri ističu slabo koordinisani anjoni  $[BF_4]^-$ ,  $[PF_6]^-$  i  $[Tf_2N]^-$  [84, 121]. Od pomenutih anjona  $[BF_4]^-$  se pokazao kao najmanje pogodan u sintezi fenolnih estara, jer zbog svoje hidrofilne prirode odvlači vodu neophodnu za normalnu katalitičku aktivnost enzima [84, 94]. Uticaj katjona zavisi od dužine bočnog niza na imidazolovom prstenu. Pokazalo se da sa povećanje broja C atoma bočnog niza dovodi do pada aktivnosti Novozyme 435 u sintezi feniletil-kafeata (CAPE) i oleil-ferulata [121, 122]. S druge strane Sun je pokazao da prinos ferulovanih glicerola raste sa porastom dužine ovog niza, a slično je pokazano i u sintezi etil-ferulata [84, 88].

Ciftci i Saldana su zaključili da superkritični CO<sub>2</sub> (SCCO<sub>2</sub>) predstavlja adekvatan reakcioni medijum za "zelenu" sintezu fenolnih lipida [95]. Da bi enzimaska sinteza bila efikasna u SCCO<sub>2</sub> neophodno je da se odigrava u homogenoj tečnoj fazi, pa su zbog toga autori prikazali izgled ovog trofaznog reakcionog medijuma (ferulna kiselina-čvrsto, laneno ulje-tečno i SCCO<sub>2</sub>-gas) na različitim temperaturama i pritiscima (slika 2.26). Crne tačke na slici 2.26 predstavljaju nerastvorenu ferulnu kiselinu koja može da dovede do zatvaranja pora imobilisanog enzima odnosno difuzionih limitacija. Vidi se da sa porastom temperature od 40-80°C raste rastvorljivost kiseline (slika 2.26a-c) i da je najhomogeniji reakcioni medijum postignut na 80°C, što je i potvrđeno eksperimentalnim

rezultatima, jer je na ovoj temperaturi dobijen stepen konverzije od 58%. S druge strane, porast pritiska doveo je takođe do stvaranja homogenog reakcionog medijuma, ali je najveći stepen konverzije ostvaren na pritisku od 215 bar. Razlog je otežan prenos mase na pritisku od 345 bar prouzrokovan povećanom gustinom SCCO<sub>2</sub> na ovom pritisku [95].



Slika 2.26. Prikaz smeše lanenog ulja, ferulne kiseline i CO<sub>2</sub> nakon 27,5 h na različitim temperaturama i pritiscima. (a) 40°C/215 bar; (b) 60 °C/215 bar; (c) 80°C/215 bar; (d) 60°C/85 bar; (e) 60°C/215 bar; (f) 60°C/345 bar [95].

Kako je jedan od glavnih prepreka za sintezu fenolnih estara u većim razmerama niska vrednost volumetrijske produktivnost procesa u organskim rastvaračima [33, 123], reakcije sinteze fenolnih estara se često izvode u sistemu bez rastvarača, čime je omogućen rad u malim zapreminama, odnosno većim koncentracijama supstrata [32, 33, 85, 89].

#### 2.4.1.7 Uticaj vode na sintezu estara fenolnih kiselina

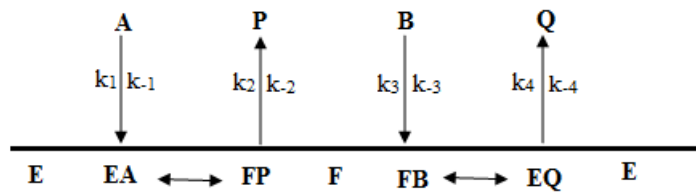
Kontrola aktivnosti vode je jedan od načina da se poveća prinos fenolnih estara, jer pored aktivnosti enzima, voda utiče i na ravnotežu reakcije. Dodavanje molekulskih sita, 3 i 4 Å, u reakcionu medijum predstavlja jednu od primenjenih strategija za održavanje aktivnosti vode na željenom nivou [77, 105, 124]. Iako ovakav pristup ima niz prednosti poput niske cene adsorbenta, jednostavne separacije i regeneracije, s druge strane zahteva pažljivu optimizaciju količine molekulskih sita, jer prevelike količine ovog adsorbenta u

reakcionom medijumu mogu da dovedu do pada u prinosu [77, 116]. Jedan od načina da se ukloni suvišna voda iz sistema, a istovremeno i smanji spoljašnji otpor prenosu mase je izvođenje reakcije u rotacionom vakuum uparivaču, pa se tako u sintezi ferulovanih moacil- i diacilglicerola pokazalo da je ova strategija efikasnija od molekulskih sita [106]. Drugi način kontrole vode u reakcionom medijumu je dodavanje parova hidrata soli [85, 111, 125]. Pokazalo se da su najveći prinosi postignuti u reakcionim medijumima u kojim je bila mala aktivnost vode, što je postignuto preekvilibracijom reakcione smeše sa LiBr ( $a_w = 0,07$ ), LiCl ( $a_w = 0,11$ ) i  $\text{CH}_3\text{COOK}$  ( $a_w = 0,23$ ) [85, 111, 126]. Ipak Xin je pokazao da je u reakciji transesterifikacije etil-ferulata i trioleina optimalna aktivnost vode od  $a_w = 0,75$ . Autori ovakav rezultat objašnjavaju činjenicom da je prisustvo vode u reakcionom medijumu uticalo na hidrolizu trioleina do monooleina i dioleina [108].

#### 2.4.2 Kinetika sinteze estara fenolnih kiselina

Enzimska kinetika se bavi uticajem različitih faktora: koncentracije enzima, supstrata i proizvoda, pH, temperature itd., na brzinu enzimske reakcije. Osnovni zadatak kinetičke analize je određivanje zakona brzine enzimske reakcije pomoću koga se može izračunati vreme odigravanja i prinos reakcije pod određenim uslovima, što je polazna osnova za projektovanje enzimskih reaktora i optimizaciju enzimskih procesa [127].

Klilend je precizno definisao pravila za nomenklaturu višesupstratnih reakcija. Supstrati se obeležavaju sa A,B,C,..., prema redosledu vezivanja za enzim, a proizvodi se prema redosledu oslobađanja obeležavaju sa P,Q,R. Enzim se u različitim stanjima obeležava sa E,F,G. Supstrati i proizvodi vezani za enzim u obliku kompleksa, obeležavaju se EA, EP, dok se ternarni kompleks predstavlja sa EAB [128, 129]. Prema nomenklaturi Klilenda dvosupstratne reakcije se klasifikuju u dve velike grupe ping-pong i sekvencijalne reakcije. Višesupstratne reakcije kod kojih se svi supstrati vežu za enzim pre oslobađanja proizvoda, odvijaju se po sekvencijalnom mehanizmu, koji se može ostvariti kao pravilan i nasumičan. Kod reakcija koje se odvijaju po ping-pong mehanizmu, proizvod se oslobađa pre nego što se svi supstrati vežu i formiraju kompleks sa enzimom. Po Klilandovom modelu, ovaj mehanizama se može prikazati kao na slici 2.27.



Slika 2.27. Šematski prikaz ping-pong bi-bi mehanizma.

Kinetički model se izvodi uz pretpostavku o stacionarnom stanju za oba kompleksa, primenom ovog uslova dobija se:

$$v = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_m^B[A] + \alpha K_m^A[B] + [A][B]} \quad (2.1)$$

gde su  $K_m^A = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ ,  $K_m^B = \frac{k_{-3}+k_4}{k_3}$  i  $\alpha = \frac{k_4}{k_2}$ .

Pri kinetičkim ispitivanjima enzimski katalizovane sinteze estara neophodno je uzeti u razmatranje i fenomen inhibicije viškom supstrata. U reakcijama esterifikacije, u zavisnosti od toga da li inhibitorno dejstvo ispoljava alkohol (jed. 2.2) ili kiselina (jed. 2.3) ili oba supstrata (jed. 2.4), kinetički modeli u skladu sa ping-pong bi bi mehanizmom su različiti [3].

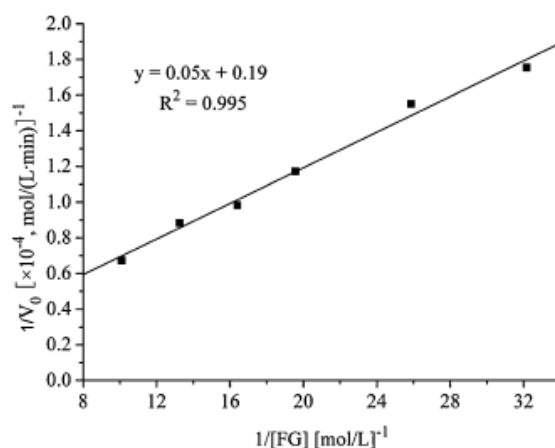
$$v = \frac{V_{\max}[A][K]}{K_m^K[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{iA}}\right) + \alpha K_m^A[K] + [A][K]} \quad (2.2)$$

$$v = \frac{V_{\max}[A][K]}{K_m^K[A] + \alpha K_m^A[K] \left(1 + \frac{[K]}{K_{iK}}\right) + [A][K]} \quad (2.3)$$

$$v = \frac{V_{\max}[A][K]}{K_m^K[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{iA}}\right) + \alpha K_m^A[K] \left(1 + \frac{[K]}{K_{iK}}\right) + [A][K]} \quad (2.4)$$

Većina bisupstratnih reakcija katalizovanih lipazom se odvija prema ping-pong bi bi mehanizmu, koji neretko uključuje inhibiciju nekim od supstrata. U literaturi je dostupan mali broj radova vezanih za kinetiku sinteze estara fenolnih kiselina, a prema dostupnim podacima može da se zaključi da se i sinteza estara fenolnih kiselina odvija prema ping-pong bi bi mehanizmu [109, 115]. Naime, Sun i saradnici su ispitali kinetiku sinteze ferulovanih lipida u reakciji etil-ferulata i ricinusovog ulja, kao i reakciji glicerol-ferulata i oleinske kiseline, pri čemu su obe reakcije katalizovane sa Novozyme 435 i pokazalo se

da se obe reakcije odvijaju prema pomenutom mehanizmu pri čemu nije uočena inhibicija nijednim od supstrata [109, 115]. Na slici 2.28 se je prikazan izgled Lajnviver-Burkovog dijagrama sinteze ferulovanih diacilglicerola [109]. Kao što se može primetiti, primenjeni model se odlično slaže sa eksperimentalnim rezultatima, međutim autori su kinetičku studiju izveli u sistemu bez rastvarača, tako da je ispitana samo jedna koncentracija oleinske kiseline pa je nemoguće utvrditi da li bi u sistemu postojala inhibicija glicerol-ferulatom. U narednoj studiji, sintezi ferulovanih lipida u reakciji transesterifikacije etil-ferulata i ricinusovog ulja u BMIMPF<sub>6</sub>, autori su varirali koncentracije oba supstrata i dobijen je Lajnviver-Burkov dijagram karakterističan za ping-pong bi bi mehanizam bez inhibicije supstratima. Naime, variranjem vrednosti koncentracije etil-ferulata pri različitim konstantnoj koncentraciji ricinusovog ulja u Lajnviver-Burkovom dijagramu su dobijene prave jednakog nagiba, što je karakteristično za ovaj mehanizam (slika 2.28)[115]. Interesantno je da u ovoj reakciji kao proizvod nastaje etanol, koji u većim koncentracijama može da inhibira Novozyme 435 [76, 130], međutim kako se reakcija izvodi u vakuumu, etanol se kontinulano odvodi iz sistema, pa je isključena mogućnost inhibicije enzima proizvodom [115].



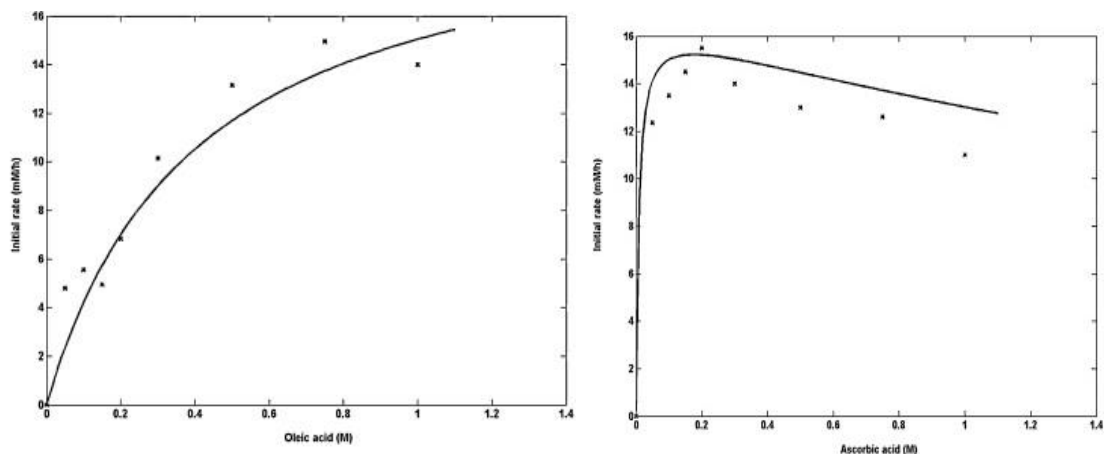
Slika 2.28. Zavisnost početne brzine sinteze ferulovanih diacilglicerola prikazana Lajnviver-Burkovim dijagramom.

Kako u literaturi nema veliki broj radova vezanih za kinetiku sinteze estara fenolnih kiselina sa Novozyme 435, u nastavku će biti predstavljeni primeri sinteze drugih estara katalizovanih sa ovim enzimom.

Bezbradica i saradnici su se bavili ispitivanjem kinetike sinteze askorbil-oleata u acetonu sa Novozyme 435, pri čemu su koncentracije oba supstrata varirane u opsegu od

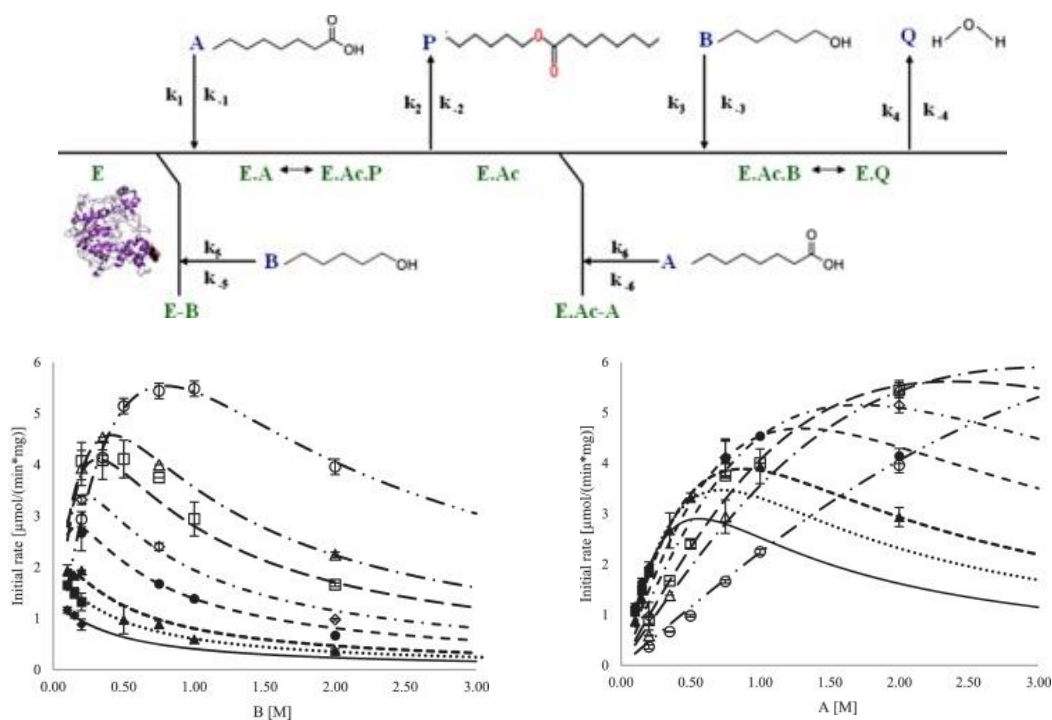
0,05-1 mol/dm<sup>3</sup>. Rezultati dobijeni u ovoj studiji prikazani su na slici 2.29. U grafičkom prikazu kinetičke studije se lako uočava da uticaj koncentracije oleinske kiseline, pri konstantnoj koncentraciji askrobinske kiseline, na brzinu reakcije ima izgled klasične Mihaelis-Mentenove krive, dok je uticaj koncentracije askrobinske kiseline nešto komplikovaniji. Naime, do koncentracije od 0,2 mol/dm<sup>3</sup> sa porastom koncentracije askrobinske kiseline raste i početna brzina reakcije, međutim pri većim koncentracijama dolazi do pada brzine usled inhibicije enzima supstratom u višku [131], pa je za opisivanje početne kinetike sinteze askorbil-oleata korišćen ping-pong bi bi mehanizam sa inhibicijom acil akceptorom u višku (jed. 2.2). Inhibiciju Novozyme 435 sa askorbinskom kiselinom su objasnili činjenicom da se, kada se u reakcionoj smeši nalazi velika koncentracija ovog supstrata, povećava verovatnoća vezivanja alkohola za lipazu pre stvaranja acil-enzim kompleksa. Tako dobijeni kompleks je neaktivan ("dead-end" kompleks) i na njega se ne može vezati molekul kiseline. Dobijeni kinetički model se zasniva na početnim brzinama reakcije pa ne opisuje adekvatno zavisnost koncentracije proizvoda od vremena reakcije nakon dužeg vremenskog perioda. Autori su pokazali da se eksperimentalni rezultati i rezultati predviđeni modelom pokazali dobro slaganje samo nakon početnih 90 min reakcije, nakon kojih je došlo do velikih odstupanja koja se pripisuju uticaju povratne reakcije hidrolize na prinos reakcije. Ova hipoteza potvrđena je dodavanjem molekulskih sita u reakcioni medijum kada je linearan porast koncentracije proizvoda sa vremenom produžen do 4 h trajanja reakcije. Kako bi dobili odgovarajući model koji opisuje zavisnost koncentracije proizvoda od vremena bilo je neophodno u model uključiti i povratnu reakciju hidrolize. Korišćenjem modela koji uključuje hidrolizu estra dobijeno je dobro slaganje modelovanih i eksperimentalnih rezultata i nakon 90 h trajanja reakcije [131].





Slika 2.29. Reprezentativne krive kinetičkog modela sinteze askorbil-oleata a)  $0,3 \text{ mol/dm}^3$  askorbinske kiseline; b)  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  oleinske kiseline.

Lopresto je ispitao kinetiku sinteze heksil-oktanoata u *n*-dekanu, variranjem koncentracije oba supstrata u velikom intervalu. Šematski prikaz mehanizma ove reakcije prikazan je na slici 2.30 [132].



Slika 2.30. a) Šematski prikaz mehanizma sinteze heksil-oktanoata; b) grafička zavisnost brzine reakcije od koncentracije heksanola pri konstantnoj koncentraciji oktanske kiseline; c) grafička zavisnost brzine reakcije od koncentracije oktanske kiseline pri konstantnoj koncentraciji heksanola [132].

Kao što se vidi na slici 2.30 rezultati dobijeni u ovoj studiji upućuju na inhibiciju enzima sa oba supstrata, pošto s porastom koncentracije oba supstrata dolazi do pada

brzine reakcije. Inhibiciju enzima supstratima u višku objašnjena je nastajanjem neaktivnih ("dead-end") kompleksa. Dobijene vrednosti kinetičkih konstanti ukazuju da enzim ima veći afinitet prema alkoholnom nego prema kiselinskom supstratu ( $K_m^A=1,205$  mol/dm<sup>3</sup>, a  $K_m^K=17,09$  mol/dm<sup>3</sup>), a vrednosti konstanti inhibicije da je oktanska kiselina jači inhibitor enzima ( $K_{iK}=0,107$  mol/dm<sup>3</sup>, a  $K_{iA}=0,355$  mol/dm<sup>3</sup>) [132]. Autori su ispitali primenljivost dobijenog kinetičkog modela za predviđanje ishoda reakcije nakon dužeg reakcionog vremena i pokazalo se da se rezultati dobijeni modelom i eksperimentalni rezultati dobro slažu u početnim fazama reakcije sinteze, dok je s produženjem reakcionog vremena odstupanje sve veće. Kao moguć razlog ove pojave autori navode aglomeraciju čestica enzima koja dovodi čime se smanjuje broj aktivnih centara enzima raspoloživih supstratu. Takođe, model pokazuje veća odstupanja pri većim koncentracijama supstrata [132]. Razlog ovakvog odstupanja eksperimentalnih rezultata od rezultata predviđenih modelom autori objašnjavaju sledećim hipotezama: povećanoj koncentraciji vode koja dovodi do stvaranja dvofaznog sistema u kom se rastvara deo heksanola; inaktivacijom enzima usled termičke denaturacije i uticajem povratne reakcije hidrolize estera. Kao zaključak, dobijeni kinetički model valjano predstavlja kinetiku sinteze heksil-oktanoata do koncentracije oba supstrata od 1 mol/dm<sup>3</sup>, iznad ovih vrednosti koncentracije odstupanja modela i eksperimentalnih rezultata su velika [132].

## **2.5 Konfiguracija protočnih reaktora primenjenih u enzimskoj sintezi estera fenolnih kiselina**

Prilikom izbora enzimskog reaktorskog sistema u obzir se uzima veliki broj faktora, pre svega izbor enzima: slobodan ili imobilisan; kontrola pH vrednosti i temperature, hemijska i biološka stabilnost supstrata i proizvoda, učestalost izmene biokatalizatora, inhibicija supstratom ili proizvodom itd. Za imobilisane enzime treba izabrati nosač odgovarajućih fizičkih i hemijskih karakteristika, odgovarajuću veličinu čestica imobilisanog enzima, neophodno je ispitati mogućnost regeneracije imobilisanog enzima itd. U procesima sa imobilisanim enzimima koriste se: reaktor sa mešanjem, reaktor sa pakovanim i fluidizovanim slojem, air-lift reaktor i membranski reaktor. Za reakcije sa slobodnim enzimom najviše se koristi šaržni reaktor sa ili bez mešanja i protočni reaktor sa ultrafiltracijom. U tabeli 2.5 su dati opšti kriterijumi za izbor reaktorskog sistema:

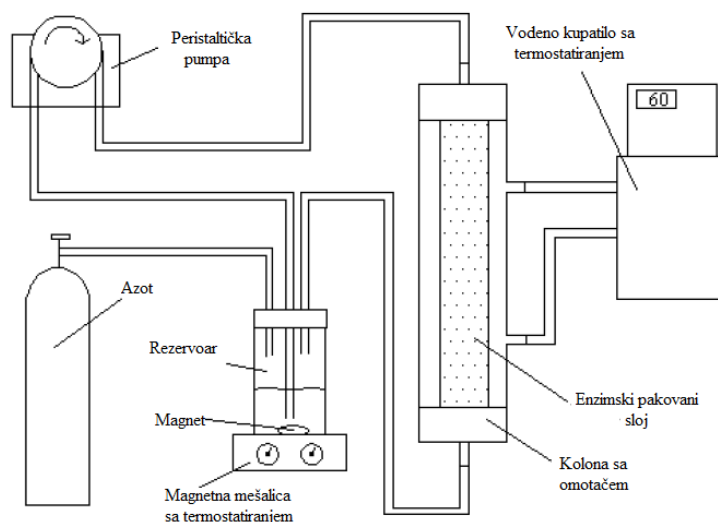
Tabela 2.5. Kriterijumi za izbor reaktora [133]

	Šaržni reaktor	Cevni reaktor sa pakovanim slojem	Protočni reaktor sa mešanjem
<i>Reakcioni medijum</i>			
jednofazni	da	da	da
dvofazni	da	nepogodan	da
<i>Kinetika reakcije</i>			
<i>Inhibicija</i>			
supstratom	Nepogodan	Nepogodan	da
Inhibicija proizvodom	da	da	nepogodan
<i>Imobilisan katalizator</i>	nepogodan (mala koncentracija)	da (velika koncentracija)	nepogodan (mala koncentracija)
<i>Mehanička oštećenja</i>	Moguća	Neuobičajena	Moguća
<i>Stabilnost</i>	Mala	dosta velika	dosta velika

Bez obzira na visoku cenu enzimskih preparata u poređenju sa reagensima koji se koriste u hemijskoj sintezi estara, moguće je razviti ekonomičan i efikasan proces za proizvodnju estara fenolnih kiselina koristeći protočne bioreaktorske sisteme koji omogućavaju ponovnu upotrebu enzima sve dok zadržava svoju katalitičku aktivnost [134]. Korišćenje imobilisanih enzima u šaržnim reaktorima u industrijskim procesima ima svojih prednosti, s obzirom na jednostavnost izvođenja procesa i mogućnost reciklaže enzima, međutim prilikom rada sa imobilisanim enzimima treba uzeti u obzir fizičke i hemijske karakteristike nosača na koji je enzim imobilisan, s obzirom na mehanički stres kojem je enzimski preparat izložen prilikom mešanja. Kao posledica izlaganja mehaničkom stresu javlja se gubitak aktivnosti enzimskog preparata usled denaturacije i spiranja enzima sa nosača, što dovodi do smanjene efikasnosti i ekonomičnosti procesa. S druge strane, za proizvodnju na industrijskom nivou, upotreba reaktora sa pakovanim slojem predstavlja isplativije rešenje zahvaljujući kontinualnom radu, efikasnom recikliranju enzima bez prethodnog razdvajanja, kao i blažim reakcionim uslovima, čime se potencijalno produžava radni vek biokatalizatora [135-137].

U poslednjih par godina, nekoliko autora je predložilo izvođenje sinteze estara fenolnih kiselina u različitim konfiguracijama kontinualnih enzimskih reaktora sa pakovanim slojem [136-140].

Laslo i saradnici su među prvima izvršili sintezu fenolnih lipida u kontinualnom reaktoru sa pakovanim slojem. Naime, ova grupa naučnika je za sintezu ferulnih mono- i diacilglicerola koristila hromatografsku kolonu napakovanu sa Novozyme 435, tako da je zapremina pakovanog sloja iznosila 85 ml [136]. Reakciona smeša, temperature 60°C je peristaltičkom pumpom uvođena na vrh kolone protokom od 2 ml/min. Efluent je po izlasku iz reaktora sakupljan u rezervoaru koji se nalazi u atmosferi azota uz konstantno mešanje odakle je pomoću pompe recirkulisan u kolonu, kao što se vidi na slici 2.31. Po potrebi je dodavana kolona sa molekulskih sita između pumpe i kolone.

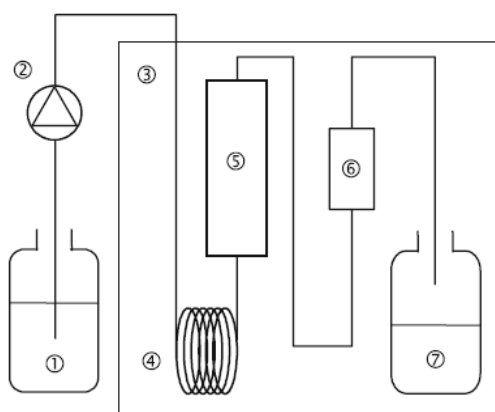


Slika 2.31. Šematski prikaz reaktora sa pakovanim slojem za proizvodnju ferulnih mono- i diacilglicerola [111].

Najviši prinos od 64% ostvaren je nakon 144 h rada. Ispitivanjem operative stabilnosti reaktora ustanovljeno je da se sa jednom šaržom enzima može izvesti nekoliko eksperimenata sa istom efikasnošću, dok se nakon dve nedelje rada konverzija proizvoda spustila malo ispod 60%. U naredne četiri nedelje rada stepen konverzije kretao se u intervalu od 52 do 58%. Male promene u efikasnosti sistema nakon nekoliko prvih eksperimenata autori pripisuju gubitku aktivnosti enzima usled termičke denaturacije i/ili promena u aktivnosti vode, a ne neefikasnom radu reaktora usled začepljenja ili pojave kanala u pakovanom sloju [136]. Poređenjem reaktora sa pakovanim slojem sa šaržnim

reaktorom sa mešanjem ustanovljeno je da je reaktor sa pakovanim slojem efikasniji ali ne u velikoj meri. Naime, početna brzina reakcije u šaržnom reaktoru je znatno veća, pa se za 20 h ostvaruje konverzija od 30% dok je u reaktoru sa pakovanim slojem reakcija gotovo duplo sporija. Međutim, s vremenom, brzina reakcije u šaržnom reaktoru značajno opada da bi nakon 144 h konverzija ostvarena u reaktoru sa pakovanim slojem bila za 15% veća u odnosu na šaržni reaktor. Razlog veće početne brzine reakcije u šaržnom reaktoru, autori pripisuju kumulativnom efektu veće specifične površine enzimskog preparata u šaržnom reaktoru koji je posledica usitnjavanja nosača mešanjem i aktivnosti slobodnog enzima koji je u tom procesu oslobođen [136].

Jošida i saradnici su dizajnirali reaktor sa pakovanim slojem za sintezu alkil-ferulata (Slika 2.32). Da bi prevazišli problem male rastvorljivosti ferulne kiseline u alkoholima koji su korišćeni i kao supstrati i kao rastvarači, jednu kolonu su napakovali ferulnom kiselinom i sonicirali je da bi se kiselina što bolje rastvorila u alkoholu. Nakon prolaska alkohola kroz kolonu sa kiselinom, reakciona smeša, koja je sada na granici zasićenosti ferulnom kiselinom upumpavana je na vrh druge kolone napakovane sa Novozyme 435, koja je na red vezana sa kolonom sa ferulnom kiselinom. Da bi sprečili zapušavanje cevi neproreagovalom ferulnom kiselinom ceo reaktorski sistem je smešten u peć koja je održavana na temperaturi od 90°C [138].

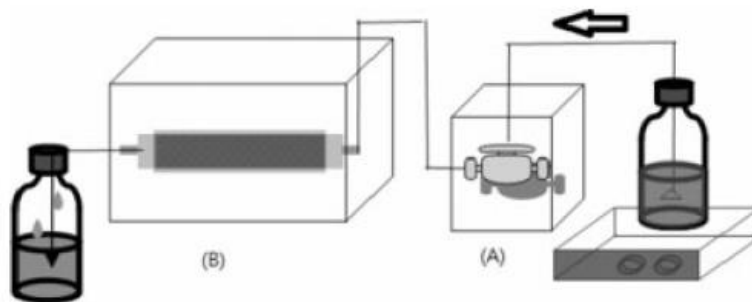


Slika 2.32. Šematski prikaz reaktora sa pakovanim slojem dizajniranog za sintezu alkil ferulata.  
 1) rezervoar alkohola; 2) pumpa; 3) peć; 4) prethodno zagrejani kalem; 5) kolona sa pakovanim slojem ferulne kiseline; 6) kolona sa pakovanim slojem imobilisanog enzima; 7) rezervoar

Ispitivanjem rastorljivosti ferulne kiseline u alifatičnim alkoholima na različitim temperaturama, pokazalo se da je entalpija rastvaranja ferulne kiseline veća u alkoholima

sa dužim ugljeničnim nizom. Na osnovu dobijenih rezultata autori su se odlučili za rad na temperaturi od 90°C, na kojoj je rastvorljivost kiseline u svakom od ispitivanih alkohola najveća, a samim tim moguće je dobiti i najveće koncentracije proizvoda. Između ispitanih alkohola, *n*-petanola, *n*-heksanola i *n*-heptanola, najveće konverzije, oko 90%, ostvarene su sa alkoholima dužeg ugljeničnog niza, pri čemu su postignute koncentracije od 0,55 mol/dm<sup>3</sup> i 0,51 mol/dm<sup>3</sup> za heksil- i heptil-ferulat, respektivno. Uočeno je da se sa povećanjem vremena zadržavanja povećava ostvareni stepen konverzije, pa su najviši stepeni konverzije postignuti kada je vreme zadržavanja iznosilo 60 h. Ovakav rezultat je u skladu sa očekivanjem, jer se povećanjem vremena zadržavanja povećava vreme kontakta između enzima i supstrata, omogućavajući vezivanje supstrata za aktivni centar enzima. Reakcija sinteze heptil-ferulata na temperaturi od 90 °C i vremenu zadržavanja od 44 h iskorišćena je kao model reakcija za ispitivanje operativne stabilnosti datog sistema. Pokazalo se da reaktor može stabilno da radi dve nedelje bez ikakvih gubitaka u konverziji, sa produktivnošću od 0,093kg/(dan dm<sup>3</sup>) [138]. U sintezi monoacil estara šećernih alkohola dobijene su znatno veće produktivnosti reaktora iste konfiguracije 0,6-0,8 kg/(dan dm<sup>3</sup>), međutim relativno niske koncentracije ferulne kiseline u reakcionoj smeši kao i mala specifičnost Novozyme 435 prema ferulnoj kiselini dovele su do nižih produktivnosti primenjenog reaktorskog sistema u sintezi alkil-ferulata [141]. Treba napomenuti da su ostvarene konverzije značajno više u odnosu na literaturne podatke vezane za šaržne reaktore, gde se kao razlog niskih vrednosti stepena konverzije u sintezi estara ferulne kiseline navodi inhibitorno dejstvo hidrokrične grupe u *p*-položaju aromatičnog prstenu na Novozyme 435 zbog kombinovanog elektronskog i sternog efekta [92].

Grupa autora sa Univerziteta u Tajvanu razvila je bioreaktor sa pakovanim slojem koji je smešten u termostatorano ultrazvučno kupatilo kao što je prikazano na slici 2.33. Autori su pošli od pretpostavke da će mehanizam dejstva ultrazvuka poboljšati efikasnost Novozyme 435 koji je korišćen kao biokatalizator. Naime, uz prisustvo ultrazvuka omogućeno je efikasnije mešanje u samoj koloni, dok se pretpostavlja da energija koja se oslobađa pri tom procesu može pozitivno da utiče na brzinu reakcije koja se odigrava u koloni, bilo da je reč o hemijskoj ili enzimskoj reakciji. Kao biokatalizator korišćen je Novozyme 435.

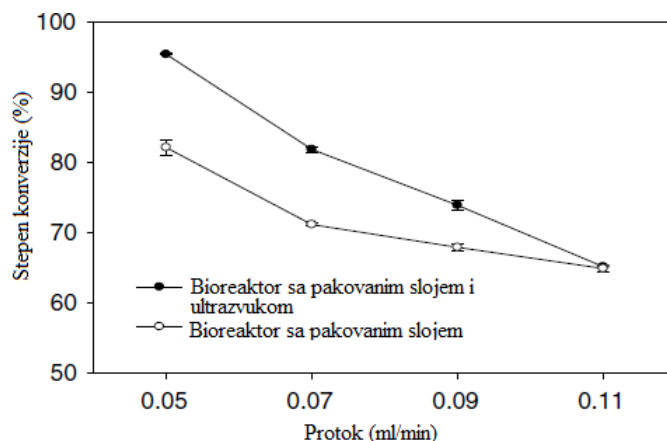


Slika 2.33. Šematski prikaz reaktora sa pakovanim slojem i ultrazvukom. A) pumpa; B) ultrazvučno kupatilo [114, 115].

Reaktor ove konfiguracije uspešno je korišćen u sintezi CAPE i oktilhidroksifenilpropionata (OHPP) [139, 140]. Prilikom sinteze OHPP-a reakcija je izvedena u sistemu bez rastvarača, tj. u velikom višku alkohola, dok je u sintezi CAPE korišćena binarna smeša rastvarača *terc*-butanola i izooktana u odnosu 1:9. Kao ključni faktori u optimizaciji procesa sinteze fenolnih estara u reaktoru sa pakovanim slojem i ultrazvukom, pokazali su se snaga ultrazvuka, protok reakcione smeše i temperatura reakcije. Da bi se ustanovio i razumeo međusobni odnos između ispitivanih parametara, autori su koristili statističke alatke Boks-Benken eksperimentalni dizajn i metodu odzivanih površina. Na osnovu dobijenih regresionih jednačina može se zaključiti da najveći efekat na ispitivani odziv, konverziju, imaju koeficijenti koji opisuju negativnu interakciju temperature sa protokom i pozitivnu interakciju temperature sa snagom ultrazvuka. Nezavisno od sintetisanog estera, optimalni uslovi pri kojima su ostvarene konverzije od skoro 100%, su bili gotovo identični, i iznosili su: 73°C, 0,046 cm<sup>3</sup>/min i 1,46 W/cm<sup>2</sup> za CAPE i 65°C, 0,05 cm<sup>3</sup>/min i 1,74 W/cm<sup>2</sup> za OHPP [139, 140]. Slično kao i kod Jošide i saradnika, smanjenje protoka, tj. povećanje vremena zadržavanja, pozitivno utiče na konverziju, dok su najviši prinosi ostvareni pri višim ispitivanim vrednostima temperature [138].

Čen i saradnicu su reakciju sinteze CAPE izveli i u reaktoru sa pakovanim slojem bez ultrazvuka i kao što se vidi sa slici 2.34, reaktor sa ultrazvučnim mešanjem je pri nižim protocima značajno efikasniji od reaktora sa pakovanim slojem, dok je pri većim protocima efikasnost reaktora ista. Razlog ovakvog rezultata može biti u činjenici da je pri većim protocima nedovoljno vreme kontakta između lipaze i supstrata, pa tako efekat dodatnog mešanja ultrazvukom nema uticaj na konverziju. S druge strane pri dužem

kontakta enzima i supstrata, dodatno mešanje reakciono smeše nastalo delovanjem ultrazvuka utiče na poboljšanje prenosa mase, dovodeći do većih vrednosti stepena konverzije. Ispitivanjem operativne stabilnosti reaktora ustanovljeno je da reaktor može da radi bez oscilacija u ostvarenim stepenima konverzije barem 6 dana [140].



Slika 2.34. Uticaj protoka na stepen konverzije u reaktoru sa pakovanim slojem i reaktoru sa pakovanim slojem i ultrazvukom [115].

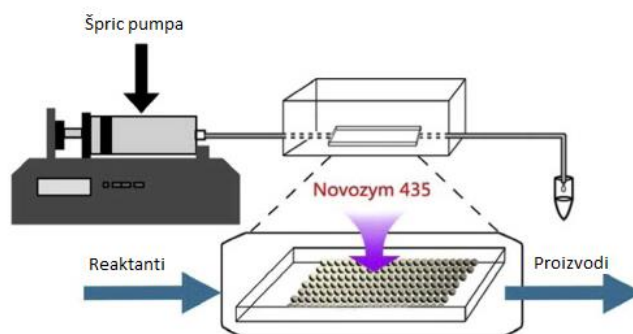
Ista grupa autora sintezu CAPE izvela je i u šaržnom reaktoru sa ultrazvukom. U ovakvom sistemu ostvaren je prinos od 96% za 9,6 h, dok je izvođenjem reakcije u kontinualnom sistemu prinos od 92% postignut za 1,5h [97, 140]. Međutim, autori nisu naveli koncentracije supstrata pri kojima je reakcije izvedena u kontinualnom sistemu, pa samo poređenje efikasnosti reaktora gubi na značaju. Šaržni reaktor sa ultrazvukom pokazao se kao efikasniji od šaržnog reaktora sa mešanjem, u kom su pri istim reakcionim uslovima ostvareni nešto niži prinosi. Razlog ovakvog rezultata je bolji prenos mase u reaktoru sa ultrazvukom usled efikasnijeg mešanja u poređenju sa mehaničkim mešanjem.

Sinteza CAPE izvedena je i u nešto drugačijoj konfiguraciji reaktora sa pakovanim slojem. Naime, Wang i saradnici su razvili mikroreaktor sa pakovanim slojem koji je uspešno korišćen u sintezi CAPE [137]. Autori ističu nedostatke primene reaktora sa pakovanim slojem i ultrazvukom u industrijskim procesima zbog velikih utrošaka energije, kao i zahteva za specifičnom opremom. Takođe, postavlja se i pitanje vezano za izbor acil donora, s obzirom na inhibitorno delovanje hidroksilnih grupa na aromatičnom prstenu kafene kiseline na Novozyme 435, kao i vode koja nastaje kao sporedni proizvod i utiče na pomeranje ravnoteže reakcije ka hidrolizi uz negativan uticaj na aktivnost



lipaze. Kao alternativu autori predlažu reakciju transesterifikacije između alkil-kafeata i feniletanola u jonskim tečnostima [137].

Mikroreaktori sa pakovanim slojem dobijaju sve širu primenu u biokatalizi, zahvaljujući svojim karakteristikama, pre svega efikasnom prenosu mase i toplote, jednostavnosti rukovanja i radu sa malim zapremina [137, 142-144]. Na ovaj način smanjuje se potreba za ljudstvom, a takođe se smanjuje i proizvodnja otpada, kao i potrošnja reagenasa, dovodeći do smanjenja ukupnih troškova proizvodnje [145]. Autori ističu da mikroreaktori sa pakovanim slojem mogu da budu efikasnije rešenje u biokatalizi u odnosu na tradicionalne šaržne reaktore zahvaljujući boljem prenosu mase i toplote koji se mogu pripisati većoj kontaktnoj površini enzima sa reakcionom smešom. Takođe, pod određenim uslovima izvođenje reakcije u ovakvim sistemima može uticati na povećanje selektivnosti procesa.



Slika 2.35. Šematski prikaz mikroreaktora [144].

Mikroreaktor (slika 2.35), korišćen u sintezi CAPE, sastoji se od dve poli-di-metil-siloksan ploče, spojene u strukturu nalik sendviču koja omogućava strukturu mikrokanaala u koje se pakuje Novozyme 435 [137, 144]. Mikroreaktor je smešten na kutiju sa termostatanjem, i reakciona smeša koja se sastojala od različitih alkil-kafeata i feniletanola u [Bmim][Tf<sub>2</sub>N] upumpavana je u mikroreaktor pri različitim protocima.

Između ispitivanih acil donora različitog ugljeničnog lanca (C1-C8), pokazalo se da se bolji prinosi ostvaruju kada su kao acil donori korišćeni alkil-ferulati sa manjim brojem C atoma. Ovakav rezultat pripisan je lošijem kontaktu između enzima i supstrata u slučaju alkil ferulata sa većim brojem C atoma, usled većih sternih smetnji. Optimalna temperatura reakcije zavisila je od primenjenog protoka i pri većim protocima stepen konverzije je rastao sa povećanjem temperature. Ovakav rezultat ukazuje da je reakcija

pri većim protocima difuziono limitirana, pa sa povećanjem temperature reakcije raste stepen konverzije usled porasta koeficijenta difuzije.

Ipak, najveći stepeni konverzije ostvareni su pri najnižem protoku, kada se 60°C pokazalo kao optimalna temperatura. Višak feniletanola pozitivno utiče na stepen konverzije, što se objašnjava pomeranjem ravnoteže reakcije transesterifikacije ka sintezi CAPE, a ujedeno se i poboljšava prenos mase, jer se povećanjem udela alkohola u reakcionoj smeši smanjuje viskozitet primenjene jonske tečnosti. Međutim veliki višak fenil-etanola pri malim protocima, dovodi do inhibicije lipaze alkoholom, pa je molski odnos od 1-25 izabran kao optimalni. Pri većim protocima, ne uočava se efekat inhibicije lipaze viškom alkohola, zbog kraćeg vremena kontakta između enzima i supstrata. Najveći prinos od 92,6% kome odgovara produktivnost od 19 mmol/(g h) ostvaren je pri protoku od 2 µl/min, tj. vremenu zadržavanja od 2,5 h. Reaktor sa pakovanim slojem pokazao se kao efikasniji od šaržnog reaktora u kome je postignuta produktivnost od 7,4 mmol/(g h). Pored toga optimalna temperatura za sintezu CAPE u šaržnom reaktoru iznosila je 80°C, što pokazuje da je izvođenjem reakcije u reaktoru sa pakovanim slojem moguće ostvariti značajnu uštedu energije pri radu u industrijskim razmerama. Razlog ovakvog rezultata posledica je većeg odnosa površine biokatalizatora i zapremine reaktora u kontinualnom sistemu, tako da je u svakom trenutku veći broj aktivnih centara enzima dostupan molekulima supstrata. Takođe, u reaktoru sa pakovanim slojem zapremina reaktora je toliko mala da su molekuli supstrata "primorani" da budu u kontaktu sa enzimom, a ostvaruju se i bolji prenos mase i toplote [137].

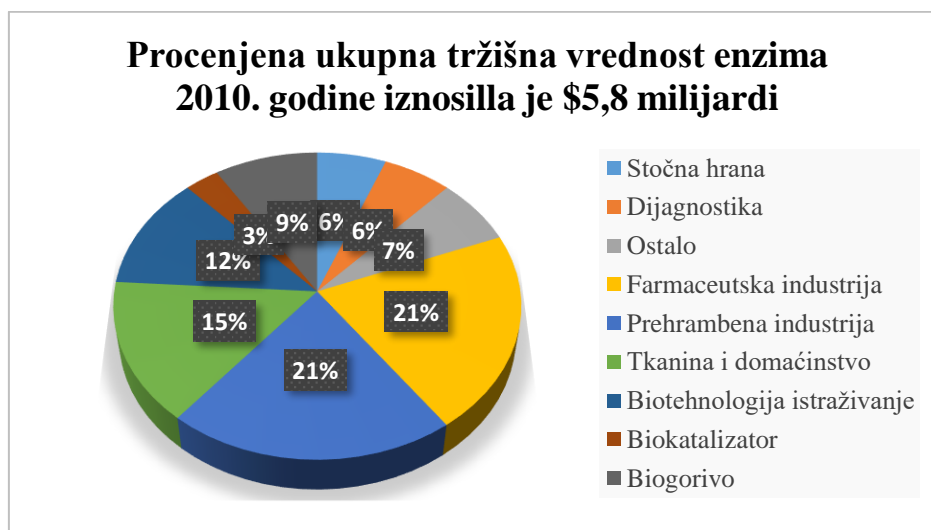
Autori su istu konfiguraciju reaktora koristili i u sintezi propil-kafeata u [Bmim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>], pri čemu je prinos maksimalni prinos od 99,5% ostvaren za 2,5 h. [144].

## **2.6 Imobilizacija enzima i njihova primena u sintezi estara fenolnih kiselina**

Bez obzira na to što enzimi mogu da katalizuju veliki broj složenih hemijskih procesa pod izuzetno blagim reakcionim uslovima, njihova upotreba na industrijskom nivou ograničena je visokom cenom komercijalno dostupnih enzimskih preparata. Naime, uprkos smanjenju energetske troškova procesa kao i troškova prečišćavanja finalnog

proizvoda cena enzimski katalizovanih industrijskih procesa i dalje nadmašuje hemijski katalizovane procese.

Jedan od načina da se poveća efikasnost i smanji cena enzimskih postupaka nalazi se u primeni imobilisanih enzima čime se omogućava njihova ponovna upotreba a istovremeno se pojednostavljuje izdvajanje enzimskog preparata iz reakcione smeše. S druge strane višestruka upotreba enzima zahteva dizajniranje veoma stabilnog enzimskog preparata, čija funkcionalna svojstva, pre svega aktivnost i selektivnost, treba da zadovolje potrebe procesa za koji su namenjene, a sam proces imobilizacije treba da bude jednostavan i isplativ. Da bi se ispunili ovi zahtevi dizajniranje efikasne metode imobilizacije enzima je postalo jedan od glavnih zadataka prilikom razvijanja ekonomičnih industrijskih enzimskih postupaka. Međutim, trenutni udeo imobilisanih enzima u ukupnom tržištu enzima (slika 2.36) je veoma mali, i drastično je pao u odnosu na 1990. kada je iznosio čak 20% tržišta industrijskih enzima [4].



Slika 2.36. Raspodela svetskog tržišta enzima po sektorima 2010. godine [4].

Razlog je niža cena slobodnih enzima, pa je sa stanovišta proizvođača neophodno da cena proizvodnje imobilisanog enzima bude opravdana njegovim poboljšanim karakteristikama ili novim poljima upotrebe u odnosu na slobodni enzim. S druge strane, u industriji se često odlučuju za kupovinu slobodnog enzima koji kasnije sami imobilišu [4]. Prednosti i mane biokatalitičkih procesa sa imobilisanim enzimima prikazani su u tabeli 2.6.

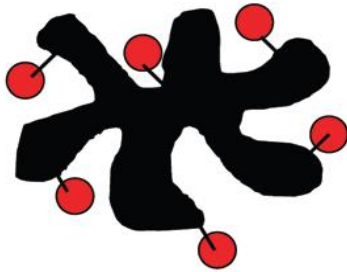
Tabela 2.6. Poređenje imobilisanih i slobodnih biokatalizatora

	Procesi sa slobodnim enzimima	Procesi sa imobilisanim enzimima
Cena procesa	Nema dodatnih troškova	Dodatni troškovi vezani za dizajn nosača i metodu imobilizacije
Ukupna produktivnost procesa	Gubitak skupog biokatalizatora, niska produktivnost procesa (kg proizvoda/kg enzima)	Ponovna upotreba skupog biokatalizatora, niska produktivnost procesa (kg proizvoda/kg enzima)
Prenos mase i difuzione limitacije	Interakcija sa okolinom bez difuzionih limitacija	Moguće limitacije u prenosu mase u zavisnosti od nosača
Proces separacije	Otežana separacija enzima/supstrata/proizvoda	Olakšana separacija iz reakcionog medijuma
Kontaminacija	Povećan rizik kontaminacije proizvoda	Smanjen rizik kontaminacije proizvoda
Stabilnost	Mala stabilnost	Povećana operativna stabilnost (pH, temperatura)
Industrijska primena	Primena u različitim grana industrije	Za primenu u nekim industrijama je neophodno poboljšati tehnike imobilizacije i pronaći bolje nosače

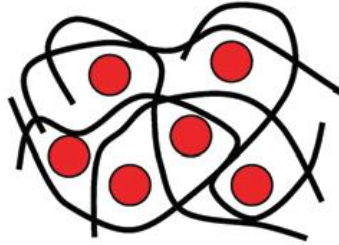
Prema jednoj od definicija imobilisan enzim je enzim koji je lokalizovan u prostornoj oblasti ograničenoj imaginarnom ili fizičkom barijerom, propustljivom za supstrate i proizvode reakcije, koji je moguće odvojiti iz reakcione smeše. Iako je prva primena imobilisanog enzima zabeležena još davne 1916. godine, prava ekspanzija u ovoj oblasti enzimologije dogodila se u proteklih 30-40 godina [127]. U ovom periodu razvijeno je mnoštvo imobilizacionih metoda, ali fokus je bio i na nalaženju nosača odgovarajućih karakteristika.

Jedan od načina za klasifikaciju metoda imobilizacije je podela na reverzibilne i ireverzibilne metode, pri čemu se smatra da je jačina veze između nosača i enzima u suprotnosti sa reverzibilnošću procesa [146]. Tako se u ireverzibilne metode svrstavaju metode pri kojima se enzim nakon imobilizacije ne može odvojiti od nosača a da se pri tom ne uništi bilo katalitička aktivnost enzima ili sam nosač. U ove metode spadaju:

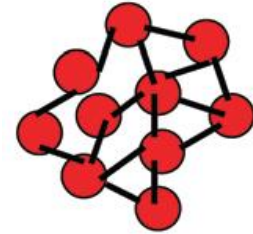
- kovalentno vezivanje enzima na čvrste nosače (slika 2.37a)
- obuhvatanje enzima matricom nosača (slika 2.37b)
- umrežavanje enzima (slika 2.37c)



a) kovalentna imobilizacija



b) obuhvatanje enzima matricom nosača



c) umrežavanje enzima

*Slika 2.37. Grafički prikaz ireverzibilnih metoda imobilizacije [35].*

S druge strane, prilikom imobilizacije enzima reverzibilnim metodama, moguće je pod blagim uslovima odvojiti enzim od nosača bez gubitka katalitičke aktivnosti zbog prirode veza koje se formiraju između enzima i nosača. U ovu grupu metoda spada

- adsorpcija enzima na čvrstim nosačima (slika 2.38)
- imobilizacija preko disulfidnih veza.



*Slika 2.38. Grafički prikaz reverzibilnih metoda imobilizacije [35].*

Tema imobilizacije enzima već je detaljno obrađena u više različitih disertacija i knjiga objavljenih na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta u Univerziteta u Beogradu [3, 127, 147].

### 2.6.1 Adsorpcija enzima

Imobilizacija enzima adsorpcijom predstavlja najjednostavniju metodu imobilizacije, koja se najčešće izvodi tako što se vodeni rastvor enzima dovede u kontakt sa nosačem, pri čemu će do imobilizacije doći ukoliko su interakcije između enzima i nosača dovoljno jake. Kako se odvija pod blagim uslovima koji ne smanjuju aktivnost enzima, glavne prednosti ove metode su očuvanje enzimske specifičnosti i aktivnosti. Takođe, još jedna od osnovnih prednosti imobilizacije enzima adsorpcijom je pristupačnost i niska cena adsorbentasa koji se koriste kao nosači. S druge strane, osnovna mana ove metode imobilizacije je mogućnost desorpcije lipaze, koja je veća u vodenoj sredini nego u organskim rastvaračima [3]. Brzina i stepen desorpcije zavise od vrste i jačine interakcija između molekula enzima i nosača, koje se menjaju promenom temperature, pH ili jonske jačine rastvora. Tako se u rastvorima velike jonske jačine desorbuje enzim vezan jonskim interakcijama, dok se pri tim uslovima postiže maksimalna hidrofobna adsorpcija. Hidrofobna adsorpcija je favorizovana pH vrednostima koje su blizu izoelektrične tačke enzima, dok je za vezivanje jonskim vezama potrebno da se imobilizacija odvija u rastvorima čija je pH vrednost iznad ili ispod vrednosti izoelektrične tačke [147]. Kada se govori o lipazama, adsorpcija se uglavnom odvija usled postojanja hidrofobnih interakcija između enzima i nosača, ali do adsorpcije može doći i usled postojanja jonskih interakcija [35].

Međutim, ne mora uvek da bude smanjena operativna stabilnost imobilizata dobijenih adsorpcijom. Kao jedan od izuzetaka ističe se Novozyme 435, imobilizat korišćen u izradi ove disertacije. Kao što je već pomenuto, Novozyme 435 je komercijalni imobilisani preparat lipaze B iz *C. antarctica*, kompanije Novo Nordisk. Lipaza je imobilisana na akrilatni polimer Lewatit VP OC 1600. Za ovaj preparat je karakteristično da ima veliku količinu vezanih proteina koji su uglavnom, ali ne isključivo, locirani na spoljašnjoj površini nosača [35].

Adsorpcija i vezivanje proteina na glinene materijale odvija se usled postojanja različitih interakcija poput izmene katjona, elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija, vodoničnih veza i Van der Valsovih sila [148]. Kako glineni materijali imaju permanentno negativno i varijabilno površinsko naelektrisanje, naelektrisani molekuli mogu da se adsorbuju na površinu glinenih materijala putem elektrostatičkih interakcija.

Takođe, ovi materijali poseduju hidrofilne/hidrofobne regione koji takođe mogu da budu odgovorni za adsorpciju enzima na gline [148]. Adsorpcija ne glinene materijale odvija se na spoljašnjoj površini gline ili u intralamelarnim kanalima, a na kom će se mestu vezati protein zavisi od prirode kako enzima tako i same gline. Tako, kaolin, koji predstavlja dostupan, vrlo koristan materijal koji zbog svoje hemijske inertnosti, otpornosti na bakterije, kao i svojih mehaničkih svojstava, predstavlja veoma interesantan materijal za imobilizaciju enzima, ima vezujuća mesta samo na spoljašnjoj površini, zbog svojih slojeva koji se proširuju [148].

### 2.6.1.1 Primena imobilisanih enzima u sintezi estara fenolnih kiselina

U literaturi ne postoji veliki broj radova koji se bave sintezom estara fenolnih kiselina imobilisanim enzimima koji nisu komercijalni preparati. Uglavnom se imobilizacija izvodi adsorpcijom ili obuhvatanjem enzima matricom nosača. Zumpanioti je uspešno sintetisao oktil- estre *p*-hidroksifenilsirćetne i propionske kiseline pomoću lipaze B iz *C. antarctica* imobilisane u organogel, dok je sinteza oktil-cinamata, oktil-kumarata i oktil-ferulata izostala. Korišćena je lipaza B iz *C. antarctica* je imobilisana u hidroksipropilmetilcelululozni (HPMC) organogel zasnovan na mikroemulzijama bez surfaktanata. Mikroemulzije su dobijene mešanjem *n*-heksana/1-propanola/TRIS pufera sa enzimom (47,2:50,8:2). Ovako pripremljene mikroemulzije su mešane sa HPMC kako bi se dobila lipaza imobilisana u organogel. Pored lipaze B korišćena je i lipaza iz *R. miehei*, međutim nisu dobijeni prinosi estara. Dobijeni rezultati ukazuju da je inhibitorski efekat dvostruke veze bočnog niza i hidroksilne grupe u *para* položaju u potpunosti inhibirao lipazu [98]. Nešto veći inhibitorski efekat uočen je kada je cimetine kiselina korišćena kao supstrat, jer su prinosi estara cimetine kiseline sa Novozyme 435 dobro dokumentovani, dok su prinosi ferulne i *p*-kumarinske kiseline u skladu sa literaturnim podacima [76, 104]. Između tri izomera hidroksifenilsirćetne kiseline najveći prinosi dobijeni su sa *para* supstituisanim izomerom u odnosu na *orto* i *meta* supstituisane izomere hidroksifenilsirćetne. Ovakav rezultat pripisan je najmanjim steričkim smetnjama između enzima i supstrata u slučaju kada se hidroksilna grupa nalazi u *para* položaju pa je najudaljenija od karboksilne funkcije kiseline. Sa ovom kiselinom prinos *n*-oktil-*p*-hidroksifenilacetata je nakon 26 dana reakcije iznosio 94%, pri čemu je koncentracija supstrata bila 100 mmol/dm<sup>3</sup> a količina enzima nije jasno definisana [98].

Horhani i saradnici su prijavili sintezu eugenol-benzoata katalizovanu sa lipazom iz *S. aureus* imobilisanom na  $\text{CaCO}_3$ . Reakcija je optimizovana sa aspekta postizanja što većeg stepena konverzije koristeći eksperimentalni dizajn i metode odzivnih površina. Dobijeno je da se maksimalni prinos estera od 75% dobija kada se reakcija izvodi sa 240 IU, pri molском odnosu benzojeve kiseline i eugenol od 1,22 rastvorenih u 4,6  $\text{cm}^3$  hloroforma na  $41^\circ\text{C}$  [101]. Treba napomenuti da autori nisu navodili proces optimizacije imobilizacije enzima, već samo optimizaciju njegove primene u sintezi estara.

Kumar je prijavio sintezu etil-ferulata pomoću komercijalne Steapsin lipaze imobilisane na celit-545. Pokazalo se da korišćenje umrežavajućeg agensa, glutaraldehida (1% v/v), povoljno utiče na stabilnost imobilisanog enzima. Kao pufer za imobilizaciju korišćen je TRIS pH 8,5, jer prinos sintetisanog estera u zavisnosti od pH ima izražen maksimum pri ovoj pH vrednosti. Pokazalo se da je sinteza favorizovana u sredinama sa manje vode, pa je rastvarač, dimetilsulfoksida, dehidratisan dodatkom molekulskih sita. Neki joni, poput  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ , takođe su imali pozitivan uticaj na prinos reakcije. Pri optimalnim uslovima reakcije,  $45^\circ\text{C}$  i koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg/cm}^3$  je nakon 6h dobijen prinos estera od  $68 \text{ mmol/dm}^3$ , odnosno 68% [100].

Mezoporozni materijali su poslednjih godina veoma popularni nosači za imobilizaciju enzima zahvaljujući velikom kapacitetu za vezivanje enzima i poboljšanoj aktivnosti zahvaljujući smeštanju enzima unutar pora nosača [81]. Torn i saradnici su ispitali mogućnost sinteze butil-ferulata pomoću feruloil esteraze imobilisane na mezoporoznu siliku. Ova grupa autora izvršila je adsorpciju enzimskog preparata Depol 740 na mezoporoznu siliku (SBA-15) sa dve veličine pora (5 nm, MPS-5 i 9 nm MPS-9). Pokazano je da se imobilizacije odvija veoma brzo, i da je već nakon 10 min postignuto ravnotežno stanje. Kako je Depol 740 mešavina velikog broja enzima, supernatanti dobijeni nakon imobilizacije enzima su testirani u hidrolizi četiri fenolna estera kako bi se utvrdilo da li je došlo do promene specifičnosti u odnosu na polazni preparat. Uočeno je da je nakon imobilizacije na MPS-5 nije došlo do promene specifičnosti prema fenolnim supstratima, što ukazuje na činjenicu da nije došlo do selektivne imobilizacije izoenzima feruloil esteraze, dok se u slučaju MPS-9 pokazalo da je došlo do selektivne adsorpcije izoenzima feruloil esteraze. Pokazano je da je na MPS-9 imobilisano dva puta više enzima nego na MPS-5, iako se na osnovu zapremine pora ova dva nosača može zaključiti da MPS-9 može da veže 60% više proteina. Uzevši u obzir i da je specifična površina MPS-



5 dva puta veća od MPS-9, autori su došli do zaključka da je veličina pora ograničavajući faktor u imobilizaciji feruloil esteraze na MPS-5 i da je većina proteina imobilisana na površini enzima, uz pretpostavku da su se veći proteini zaglavili na ulazu u pore i na taj način zaklonili celu unutrašnjost za druge proteine. U skladu sa vezanim proteinima bila je i transesterifikaciona aktivnost dobijenih imobilizata, pa je MPS-9 bio značajno efikasniji u sintezi butil-ferulata, pri čemu je specifična aktivnost transesterifikacije bila 3,5 puta veća. Rezultati ukazuju na povećanu aktivnost enzima prilikom imobilizacije u MPS, pri čemu nije razjašnjen mehanizam po kom se povećava aktivnost enzima prilikom njegovog smeštanja u pore nosača. Imobilizacijom feruloil esteraze došlo je do promene specifičnosti enzima nevezano od veličine pora.

## 3 EKSPERIMENTALNI DEO

### 3.1 Materijali i metode

#### 3.1.1 Materijali

U reakcijama sinteze estara fenolnih kiselina korišćeni su sledeći enzimski preparati:

- Lipaza iz *C. antarctica*, Novozyme 435 (Novo Nordisk, Danska).
- Lipaza iz *C. antarctica*, Novozyme L (Novo Nordisk, Danska).
- Lipaza iz *R. miehei*, Lipozyme RM IM (Novo Nordisk, Danska).
- Lipaze iz: *P. aeruginosa* san-ai, *P. putida* B21, *R. oryzae* i *A.niger* izolovane na katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.
- Lipaza iz *C. rugosa* (Novo Nordisk, Danska).
- Lipaza iz svinjskog pankreasa (Novo Nordisk, Danska).

Kao acil donori u enzimskoj sintezi estara fenolnih kiselina korišćeni su sledeći supstrati:

- Cimetna kiselina (Sigma Aldrich, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma Aldrich, SAD)
- ferulna kiselina (Sigma Aldrich, SAD)
- kafena kiselina (Sigma Aldrich, SAD)
- dihidrokafena kiselina (Sigma Aldrich, SAD)
- *p*-hidroksifenilpropionska kiselina (Acros Organics, SAD)
- *p*-metoksicimetna kiselina sintetisana na Katedri za Organsku hemiju Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
- etil cinamat (Sigma Aldrich, SAD)

Kao acil akceptori u reakcijama sinteze estara fenolnih kiselina korišćeni su sledeći alkoholi:

- etanol (Zorka Pharma, Republika Srbija),
- propanol (Lach-Ner, Republika Češka)
- butanol (Lach-Ner, Republika Češka)
- pentanol (Lach-Ner, Republika Češka)

- heksanol (Fluka, Švajcarska)
- heptanol (Lach-Ner, Republika Češka)
- oktanol (Sigma Aldrich, SAD)
- oleil alkohol (Sigma Aldrich, SAD)
- benzil alkohol (Fluka, Švajcarska)
- eugenol (Sigma Aldrich, SAD)

Rastvarači korišćeni kao reakcioni medijumi u sintezi estara fenolnih kiselina su:

- aceton (Zorka Pharma, Republika Srbija)
- *tert*-butanol (Sigma Aldrich, SAD)
- hloroform (Sigma Aldrich, SAD)
- *n*-heksan (Carlo Erba, Italija)
- izooktan (Centrohem, Republika Srbija)
- heksadekan (Sigma Aldrich, SAD)

Kao nosač za imobilizaciju lipaze su korišćeni:

- Kaolin (Carlo Erba, Italija)

Za određivanje antioksidativne i antikoagulacione aktivnosti korišćene su sledeće hemikalije:

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH (Sigma Aldrich, SAD)
- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina, HEPES (Sigma Aldrich, SAD)
- Natrijum-hlorid (NaCl) (Centrohem, Republika Srbija)
- Kalcijum-hlorid (CaCl<sub>2</sub>) (Centrohem, Republika Srbija)

Ostale hemikalije koje su korišćene za određivanje koncentracije sintetisanih estara, kao i pripremu potrebnih reagenasa su:

- metanol (Lachema, Češka)
- etanol (96%) (Zorka Pharma, Republika Srbija)
- fenolftalein (Merck-Alkaloid, Makedonija)
- natrijum-hidroksid (NaOH, Lachema, Republika Češka)
- dinatrijum-hidrogenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Centrohem, Republika Srbija)
- natrijum-dihidrogenfosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Centrohem, Republika Srbija)
- Natrijum-acetat (CH<sub>3</sub>COONa×3H<sub>2</sub>O, EuroHemija, Srbija)

- glacijalna sirćetna kiselina (Lachema, Češka)
- glicin (Sigma Aldrich, SAD)
- *p*-nitrofenil butirat (Sigma Aldrich, SAD)
- dioksan (Sigma Aldrich, SAD)
- molekulska sita, 3 Å, 1,6 mm (Sigma Aldrich, SAD)

### 3.1.2 Instrumenti

- UV-Vis spektrofotometar (Ultrospec™ 3300 Amersham Biosciences, Velika Britanija)
- Peristaltička pumpa (Labor-Schlauchpumpe PLP 66, Behr Labour-Technik, Nemačka)
- vodeno kupatilo (VEB MLW Prüfgerate-Werk, Nemačka)
- vodeneo kupatilo sa šejkerom (MS3 Memmert, Nemačka)
- orbitalna tresilica (IKA® KS 4000, IKA, Nemačka)
- magnetna mešalica (IKA, Nemačka)
- Uređaj za tečnu hromatografiju visokih performansi (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Thermo Scientific, SAD)
- ELISA reader (RT 6100, Rayto, Kina)
- Potencijometar/galvanometar (SP-200 BioLogic Science Instruments, Francuska)
- Infracrveni spektrometar (Bomem MB 100, Hartmann & Braun, Nemačka)
- Skenirajući elektronski mikroskop (Mira3 XMU, TESCAN, SAD)
- pH metar (inoLab pH 720 WTW, Nemačka)
- Tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000, Japan)
- Analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
- Ultrazvučno kupatilo, tip USK 28, radna frekvencija 40 kHz (EI Niš, Srbija)
- Električna peć za žarenje (Instrumentaria (50-1200°C), Hrvatska)
- Uređaj za merenje srednje veličine čestica i zeta potencijala (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija)
- Centrifuga (MiniSpin Eppendorf, SAD)

### 3.1.3 Metode

#### 3.1.3.1 Enzimska sinteza estara fenolnih kiselina u šaržnom reaktoru

Reakcija esterifikacije fenolnih kiselina, katalizovana komercijalnim imobilisanim lipazama različitog porekla (Novozyme 435 i Lipozyme RM IM), izvođena je u erlenmajerima od 100 cm<sup>3</sup>. Tipično se reakciona smeša, 5 cm<sup>3</sup>, sastojala od 0,835 mmol fenolne kiseline, 12,525 mmol alkohola i izooktana koji se dodavan do postizanja željene reakciona zapremine. U slučaju ferulne i kafene kiseline korišćene su manje količine reaktanata zbog loše rastvorljivosti ovih jedinjenja i to 0,1 mmol kiseline i 1,5 mmol alkohola. Kako bi se inicirala reakcija sinteze estara, u reakcionu smešu je dodavano 75 mg odgovarajućeg preparata lipaze. Reakcije su prekinute nakon 7 dana odvajanjem imobilisanog enzima od reakcione smeše. Pre svake reakcije, u supstrate i rastvarač su dodavana aktivirana molekulska sita od 3 Å koja su nakon 24 h odvojena, a supstrati dalje korišćeni u reakcijama sinteze. Koncentracija proizvoda je dalje određivana prema metodama 3.1.3.4 i 3.1.3.5. Reakcije su izvedene u šejkeru sa termostatom na 55°C i 250 o/min.

#### 3.1.3.2 Optimizacija sinteze estara cimetne kiseline

##### 3.1.3.2.1 Odabir acil akceptora

U cilju odabira najboljeg acil akceptora za reakciju sinteze estara cimetne kiseline korišćeni su: etanol, *n*-propanol, *n*-butanol, *n*-pentanol, *n*-heksanol, *n*-heptanol, *n*-oktanol, oleil i benzil alkohol i eugenol. Ostali reakcioni parametri su imali iste vrednosti kao u metodi 3.1.3.1, s tim što je uticaj acil akceptora ispitan i pri vrednosti molskog odnosa od 1:3 (n(kis):n(alk)). Uticaj prirode acil akceptora na stepen konverzije cimetne kiseline, takođe je ispitan i sa reaktantima koji nisu dehidrirani sa molekulskim sitima.

##### 3.1.3.2.2 Odabir reakcionog medijuma

Organski rastvarači širokog opsega polarnosti korišćeni su kao reakcioni medijumi u sintezi estara cimetne kiseline, pri čemu su svi ostali reakcioni parametri imali vrednosti kao u metodi 3.1.3.1. Ispitani su: aceton ( $\log P = -0,23$ ), *tert*-butanol ( $\log P = 0,35$ ), *n*-butanol ( $\log P = -0,8$ ), hloroform ( $\log P = 2,0$ ), *n*-heksan ( $\log P = 3,5$ ), *n*-heptan ( $\log P = 4,0$ ), heksadekan ( $\log P = 4,5$ ). Svi ostali reakcioni parametri imali su vrednosti kao u metodi 3.1.3.1.

### 3.1.3.2.3 Odabir brzine mešanja

Uticaj intenziteta mešanja na aktivnost Novozyme 435 u reakciji sinteze etil- i oleil-cinamata ispitana je variranjem broja obrtaja u opsegu od 100-250 o/min. Svi ostali reakcioni parametri imali su vrednosti kao u metodi 3.1.3.1.

### 3.1.3.2.4 Odabir molskog odnosa supstrata

U cilju nalaženja optimalnog molskog odnosa reakcije sinteze etil-cinamata u izooktanu, molski odnos supstrata variran je od 1:3 (n(kis):n(alk)) do 1:20 (n(kis):n(alk)), odnosno koncentraciji etanola od 0,51-2,34 mol/dm<sup>3</sup>, pri koncentracija enzima od 15 mg/cm<sup>3</sup> i 200 o/min.

### 3.1.3.2.5 Odabir reakcione temperature

Nalaženje optimalne temperature sinteze etil-cinamata izvedeno je variranjem temperature u opsegu od 35-75°C, pri čemu su ostali parametri imali svoje optimalne vrednosti. Energija aktivacije ( $E_a$ ) sinteze etil-cinamata izračunata je prema Arenijusovoj jednačini:

$$v_0 = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (3.1)$$

gde je  $v_0$  početna brzina reakcije na odgovarajućoj temperaturi, A je konstanta, R je univerzalna gasna konstanta (8,314 mol/J/K), T temperatura reakcije u K.

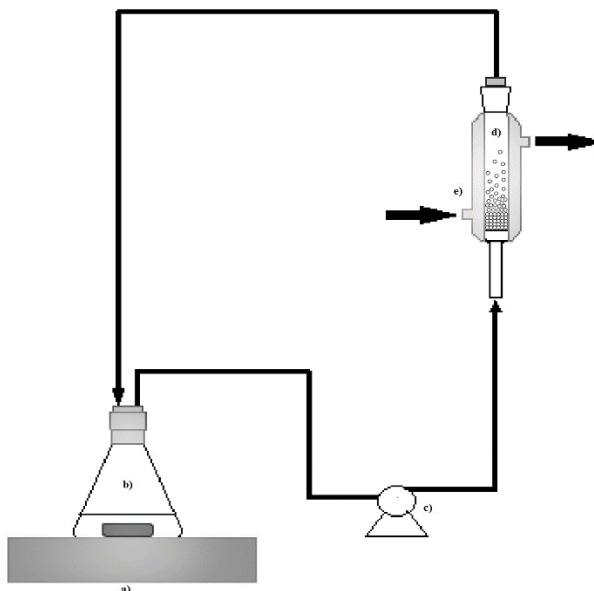
### 3.1.3.2.6 Sintaza oleil-cinamata alkoholizom etil-cinamata

Reakcija sinteze oleil cinamata izvedena je u izookatnu pri koncentraciji etil-cinamata od 0,17 mol/dm<sup>3</sup> i koncentraciji oleil alkohola od 0,51 i 2,55 mol/dm<sup>3</sup> u ukupnoj zapremini od 5 cm<sup>3</sup>. Reakcije su izvedene u erlenmajerima od 100 cm<sup>3</sup> pri koncentraciji enzima od 15 mg/ cm<sup>3</sup> na 55°C i 250 o/min.

### 3.1.3.3 Enzimaska sinteza etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem

Operativne karakteristike imobilisane lipaze u protočnom sistemu ispitane su staklenoj cilindričnoj koloni (136 mm×9mm) sa spoljašnjim omotačem koji služi za održavanje temperature na 55±0,5°C, koja je tipično bila napunjena sa 0,375 g Novozyme 435. Reakciona smeša (50 cm<sup>3</sup>) koja se sastojala od cimetine kiseline (0,17 mol/dm<sup>3</sup>) i

etanola ( $0,51 \text{ mol/dm}^3$ ) u *terc*-butanolu upumpavana je u kolonu pomoću peristaltičke pumpe pri konstantnom protoku kao što je prikazano na slici 3.1.



Slika 3.1. Šematski prikaz reaktora sa fluidizovanim slojem, a) magnetna mešalica; b) rezervoar; c) peristaltička pumpa; d) kolona sa fluidizovanim slojem; e) omotač kolone.

Reakcija esterifikacije se odvijala stalnom recirkulacijom reakcione smeše kroz reaktor sa fluidizovanim slojem, a napredovanje reakcije je praćeno uzorkovanjem iz rezervoara u različitim vremenskim intervalima. Prilikom izvođenja reakcije vodilo se računa da vazduh iz sistema bude potpuno uklonjen, jer značajno utiče na smanjenje kontaktne površine između enzima i supstrata. Reakcija je najčešće praćena šest časova pri čemu su uzorci uzimani sa razmakom od četiri sata. Uzimao se  $1 \text{ cm}^3$  reakcione smeše iz rezervoara koji se prenosio u erlenmajer, zatim se dodavao  $1 \text{ cm}^3$  1% rastvora fenolftaleina u metanolu i smeša je titrisana  $0,05 \text{ mol/dm}^3$  rastvorom natrijum-hidroksida do pojave ružičaste boje. Prinos estra se određivao volumetrijski po metodi 3.1.3.4.

Variranje protoka reakcione smeše je korišćeno u cilju dobijanja odnosa između stepena konverzije i vremena zadržavanja, jer vreme zadržavanja određuje vreme kontakta između enzima i supstrata (jed. 3.1). Protok reakcione smeše variran je između  $0,9 \text{ cm}^3/\text{min}$  i  $5,1 \text{ cm}^3/\text{min}$  što odgovara zapremini fluidizovanog sloja između 2,7 i  $6,1 \text{ cm}^3$ , odnosno vremenu zadržavanja između: 1,2 min do 3,21 min.

$$\tau_{fl} = \frac{V_{fl}}{\dot{V}} \quad (3.2)$$

gde je  $V_{fl}$  zapremina fluidizovanog sloja,  $\dot{V}$  zapreminski protok reakcione smeše i  $\tau_{fl}$  je vreme zadržavanja.

### **3.1.3.4 Ispitivanje početne kinetike sinteze etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom reaktoru**

Početna kinetika sinteze etil-cinamata u oba bioreaktorska sistema izvedena je u *tert*-butanolu, na 55°C, pri koncentraciji enzima od 7,5 mg/cm<sup>3</sup>, pri čemu je koncentracija cimetine kiseline varirana u opsegu od 0,1-0,7 mol/dm<sup>3</sup>, dok je koncentracija etanola varirana u opsegu od 0,05-2,51 mol/dm<sup>3</sup>. Da bi se pratila početna kinetika, odnosno da bi bili sigurni da je proreagovalo manje od 20% supstrata, eksperimenti u šaržnom bioreaktoru su prekinuti nakon 23 h, a u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem nakon 6 h.

### **3.1.3.5 Enzimaska sinteza estara fenolnih kiselina u šaržnom reaktoru sa lipazom imobilisanom na metakaolin**

Slično kao u metodi 3.1.3.1 sve reakcije su izvedene u erlenmjerima zapremine 50 cm<sup>3</sup> u šejkeru sa termostatom na 55°C i 200 o/min, pri čemu je koncentraciji fenolne kiseline iznosila 0,17 mol/dm<sup>3</sup>, a koncentracija alkohola od 0,51 mol/dm<sup>3</sup>. Reakciona smeša je do ukupne zapremine od 2,5 cm<sup>3</sup> dopunjena izooktanom, pri čemu su reakcije inicirane dodatkom 20 mg lipaze B imobilisane na metakaolin.

### **3.1.3.6 Određivanje prinosa estra volumetrijskim određivanjem sadržaja nepromreagovale fenolne kiseline**

Količina nepromreagovale kiseline određivana je titracijom 0,05 mol/dm<sup>3</sup> rastvorom NaOH. Kao indikator korišćen je fenolftalein. Kraj titracije određen je pojavom svetle ružičaste boje u sistemu, koja je stabilna oko 1 minut. Reakciona smeša titrisana je na početku i na kraju reakcije, a stepen esterifikacije,  $Y(\%)$  računat je prema jednačini:



$$Y(\%) = \frac{(V_{sp} - V_u)}{V_{sp}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

gde je  $V_{sp}$ - zapremina rastvora NaOH utrošenog na titraciju početne reakcione smeše (slepa proba),  $V_u$ - zapremina rastvora NaOH utrošenog na titraciju uzorka.

### 3.1.3.7 Određivanje prinosa estra RP-HPLC metodom

Uzorak za analizu pripremljen je tako što je prvo uparen do suva, a zatim rastvoren u 0,5 cm<sup>3</sup> metanola i dodatno razblažen u zavisnosti od sintetisanog estra. Analiza razblaženog uzorka je vršena primenom RP-HPLC metode (reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi) na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific uređaju. Kao stacionarna (nepolarna) faza, korišćena je C18 kolona (Hypersil gold C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm). Eluent je bio metanol sa 0,1% mravlje kiseline, i propušan je kroz kolonu protokom od 1 cm<sup>3</sup>/min. Retencionna vremena i površine pikova, dobijeni su UV detekcijom na 280 nm, osim za kafenu i ferulnu kiselinu kada je detekcija vršena na 324 nm. U slučaju analize uzorka etil-cinamata protok eluenta je bio 0,4 cm<sup>3</sup>/min. U slučaju etil-, propil- i butil-ferulata eluiranje se vrši u gradijentu 97-100% (B) u toku 7,5 min, pri čemu je sastav mobilnih faza sledeći: A- voda i B-metanol sa 0,1% mravlje kiseline.

### 3.1.3.8 Imobilizacija lipaze B iz *C.antarctica* na kaolin

Pre imobilizacije kaolin se hidrira vodom do sadržaja od 50%, a zatim se peče u laboratorijskoj peći na 550°C u toku 2 h [149]. Ovako pripremljeni uzorak se zatim temeljno ispere vodom, centrifugira, suši i čuva do imobilizacije.

Imobilizacija je izvedena u vialama zapremine 5 cm<sup>3</sup>, tako što je 50 mg prethodno pripremljenog kaolina pomešano 2 cm<sup>3</sup> rastvora CALB L (12,5-125 IU/cm<sup>3</sup>) u odgovarajućem puferu. Korišćeni su puferi koji omogućavaju radu u širokom opsegu pH vrednosti, pH 4-10, pri čemu je za pH 4 i pH 5 korišćen acetatni pufer, za pH 7 i pH 8 fosfati pufer i pH 9 i pH 10 glicin-NaOH. Na optimalnoj pH vrednosti ispitan je uticaj jonske jačine primenjenog pufera i to koristeći 10 mmol/dm<sup>3</sup>, 100 mmol/dm<sup>3</sup> i 1 mol/dm<sup>3</sup> pufer. Imobilizacija je izvedena uz blago mešanje, 100 o/min, na sobnoj temperaturi u toku 4 h, osim ako nije praćena kinetika imobilizacije, kada je imobilizacija trajala 24 h. Po završenoj imobilizaciji, uzorci su centrifugirani i ispirani dva puta sa odgovarajućim puferom.

### 3.1.3.9 Određivanje aktivnosti slobodne i imobilisane lipaze

Za određivanje lipolitičke aktivnosti slobodne i imobilisane lipaze B iz *C.antarctica* korišćena je metoda koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije *p*-nitrofenola (*p*NF), koji nastaje u reakciji hidrolize *p*-nitrofenol-butirata (*p*NFB) katalizovanoj lipazom.

Stok rastvor 50 mmol/dm<sup>3</sup> *p*NFB se pripremi u dioksanu i neposredno pred merenje lipolitičke aktivnosti uzorka, ovaj rastvor je potrebno razblažiti 125 puta u 25 mmol/dm<sup>3</sup> fosfatnom puferu pH 8. Reakciona smeša se sastoji od 0,99 cm<sup>3</sup> ovako pripremljenog supstrata i 0,01 cm<sup>3</sup> rastvora lipaze. Napredovanje reakcije je praćeno spektrofotometrijski na 410 nm na svakih 20 s u toku 3 min. Prilikom rada sa imobilisanim enzimom, metoda se malo modifikuje, pa se u spektrofotometrijsku kivetu sipa 3 cm<sup>3</sup> rastvora supstrata i doda 5 mg imobilisanog enzima, koji se uz pomoć magneta neprekidno meša na magnetnoj mešalici. Apsorbanca se prati 3 min na svakih 20 s. Jedinica enzimske aktivnosti (IU) je definisana kao količina enzima koja oslobađa 1 μmol *p*NF po minuti pri opisanim uslovima ( $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ ,  $\varepsilon = 1500 \text{ dm}^3/(\text{mol cm})$ ).

Prinos imobilizacije i prinos aktivnosti računati su prema sledećim formulama:

$$Y_i(\%) = \frac{P_1}{P_0} \cdot 100 \quad (3.4)$$

$$Y_A(\%) = \frac{A_1}{A_0} \cdot 100 \quad (3.5)$$

gde,  $P_1$  predstavlja količinu vezanih proteina,  $P_0$  količinu unetih proteina,  $A_1$  je aktivnost imobilizata, dok je  $A_0$  uneta aktivnost.

### 3.1.3.10 Karakterizacija nosača i imobilisanog enzima

#### 3.1.3.10.1 Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Za FT-IR analize korišćeno je 3 mg uzorka koji se pomeša i spraši sa 147 mg kalijum bromida. Smeša se zatim komprimuje u tablete pod pritiskom od 11 t, u trajanju od oko 2 min. Dobijeni spektri su u rasponu talasnog broja od 400–4000 cm<sup>-1</sup>, i na rezoluciji spektra od 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 3.1.3.10.2 Difrakcija X zracima

Fazni sastav dobijenih uzoraka određivan je rendgenskom difrakcijom praha na Ital Structure APD 2000 difraktometru sa Brag-Brentanovom geometrijom sa  $\text{CuK}\alpha$  zračenjem (Ni filter). Uzorci su ispitani na sobnoj temperaturi u opsegu  $2\theta$  5–70° sa korakom 0,02° i vremenskim zadržavanjem 2 s na svakom koraku.

#### 3.1.3.10.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena u cilju vizuelizacije morfologije površine kaolina i metakaolina. Pre snimanja uzorci su presvučeni Au-Pd smešom pomoću raspršivača. Za mikroskopiranje je korišćen uređaj TESCAN Mira3 XMU na 20 kV.

#### 3.1.3.10.4 Određivanje raspodele veličina čestica i zeta potencijala

Prosečna veličina čestica (hidrodinamički prosečan prečnik, eng. *intesity-weighted mean diameter, z-average*) razblažene suspenzije kaolina i metakaolina (0,1 mg/cm<sup>3</sup>), merena je na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Velika Britanija) na 25±0,1°C, primenom tehnike dinamičkog rasipanja svetlosti (*Dynamic Light Scattering, DLS*, tzv. foton korelaciona spektroskopija, *Photon Correlation Spectroscopy, PCS*). Ovom tehnikom meri se stepen fluktuacije intenziteta rasute svetlosti ( $\lambda = 633$  nm dobijene He–Ne laserom pod uglom rasipanja od 173°) usled Braunovog kretanja čestica u uzorku i prevodi u veličinu čestica pomoću Stoks-Ajnštajnovе jednačine. Uzorci su pre merenja 500 puta razblaženi visokoprečišćenom vodom, a merenje je izvedeno u polistirenskim kivetama za jednokratnu upotrebu, pri čemu je svaki uzorak je meren tri puta.

Isti uređaj korišćen je i za određivanje zeta potencijala (elektrokinetičkog potencijala) čestica metakaolina, kao mere stabilnosti koloidnog sistema, na osnovu njihove elektroforetske pokretljivosti, a primenom Smoluhovski jednačine:  $\zeta = \mu\eta/\varepsilon$ , gde je  $\zeta$ -zeta potencijal,  $\mu$ -pokretljivost,  $\eta$ -viskoznost suspenzije, a  $\varepsilon$ -dielektrična konstanta rastvarača. Takođe, promena zeta potencijala čestica sa promenom pH određivana je u stabilizovanoj disperziji metakaolina u 1 mmol/dm<sup>3</sup> KCl (0,1 mg/cm<sup>3</sup>). U ovim eksperimentima, promena pH vrednost ispitivane disperzije vršena je postepenim dodavanjem rastvora

hlorovodonične kiseline ( $0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ ) i natrijum hidroksida ( $0,5 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaOH}$ ) primenom MPT-2 autotitratora (Malvern Instruments, Velika Britanija).

### 3.1.3.11 Određivanje sadržaja proteina metodom po Bradfordu [150].

Određivanje sadržaja proteina ovom tehnikom se bazira na promeni maksimuma apsorpcije kiselog rastvora Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G 250) boje sa 465 nm na 595 nm pri vezivanju za proteine. Anjonski (plavi) oblik boje stabilizuje hidrofobne i jonske interakcije sa proteinom, što prouzrokuje vidljivu promenu boje. Boja se menja iz crveno-smeđe u plavu. Boja prvenstveno reaguje sa ostacima arginina, ali reaguje i sa ostacima histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Osetljivost metoda je oko 5 - 200  $\mu\text{g}$  proteina, u zavisnosti od kvaliteta boje, a linearna zavisnost je u opsegu od 0 – 2 mg proteina.

Priprema reagensa:

Odmeri se 100 mg CBB G 250 u normalni sud od  $1 \text{ dm}^3$ . U njega se doda  $100 \text{ cm}^3$  85% ortofosforne kiseline  $50 \text{ cm}^3$  95% metanola, oko  $300 \text{ cm}^3$  destilovane vode i meša 2 časa na sobnoj temperaturi. Normalni sud se zatim odloži na tamno mesto preko noći. Sutradan se dopuni vodom do zapremine  $1 \text{ dm}^3$  i profiltrira kroz grubi filter papir u tamnu bocu. Reagens je stabilan više meseci. Čuva se na tamnom i hladnom mestu.

Procedura:

Odmeri se  $5 \text{ cm}^3$  Bradfordovog reagensa i  $1 \text{ cm}^3$  rastvora enzima u epruvetu. Dobro promućkati i ostaviti 5 minuta da se razvije plava boja. Nakon toga se meri apsorbancu na 595 nm.

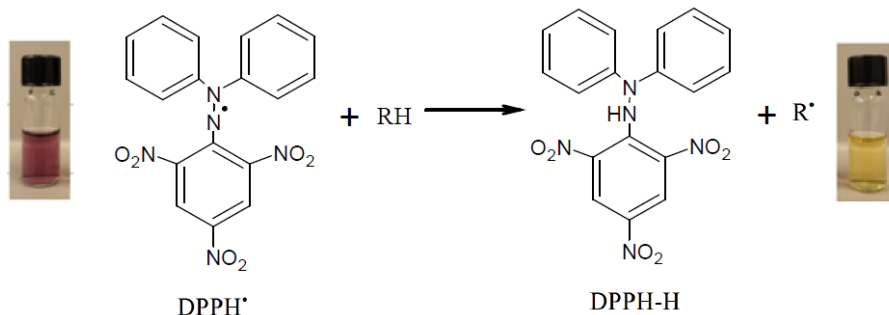
Određivanje standardne krive:

Pre svake serije eksperimenata određena je standardna kriva. Kao standard korišćen je preparat lipaze. Standardni rastvori u opsegu 0,1 do  $0,5 \text{ mg/cm}^3$  dobijeni su razblaživanjem osnovnog rastvora koncentracije, a sadržaj proteina u rastvorima poznate koncentracije određivan je po već opisanoj proceduri.

### 3.1.3.12 Određivanje antioksidativne aktivnosti sintetisanih estara pomoću DPPH metode

DPPH metoda je jedna od najčešće korišćenih *in vitro* metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti zahvaljujući jednostavnosti, ekonomičnosti i tačnosti [151].

Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom, zasniva se na sposobnosti jedinjenja da doniraju vodonik ili elektron, pri čemu stabilni azotni DPPH• radikal prelazi u redukovani neutralni DPPH-H (slika 3.2). Ova reakcija praćena je promenom boje ljubičasto obojenog stabilnog DPPH• radikala do žuto obojene redukovane forme-dijamagnetičnog molekula hidrazina.



Slika 3.2. Redukcija DPPH• radikala do neutralnog DPPH-H.

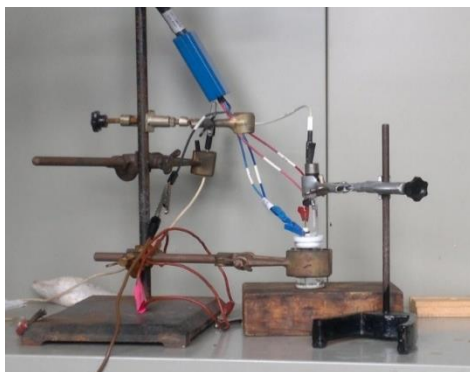
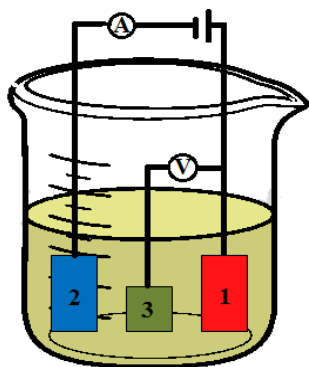
Za određivanje antioksidativne aktivnosti koristi se sveže pripremljeni 0,1 mmol/dm<sup>3</sup> rastvor DPPH• radikala u metanolu. Ovako pripremljen rastvor DPPH• meša se sa spremljenim uzorcima fenolnih kiselina i prečišćenih sintetisanih estara različite koncentracije. Finalna koncentracija fenolnih kiselina i estara u reakcionoj smeši zavisi od vrste kiseline/estra, pa se tako koncentracije za ferulnu kiselinu koja je poznati antioksidans kreću u opsegu od 1-50 μmol/dm<sup>3</sup>, dok su u slučaju cimetine kiseline i njenih estara koncentracije dosta veće 0,05-0,17 mol/dm<sup>3</sup>. Reakciona smeša koja se sastoji od 0,2 cm<sup>3</sup> uzorka i 1,8 cm<sup>3</sup> pripremljenog DPPH• rastvora, dobro se izmeša na vorteksu i ostavi 30 min u mraku, nakon čega se apsorbanca meri spektrofotometrijski na 517 nm. Antioksidativna aktivnost određena primenom DPPH metode izražava se kao RSC vrednost, tj. kapacitet "hvatanja" radikala, a izračunava se prema sledećoj formuli:

$$RSC (\%) = \left(1 - \frac{A_u - A_b}{A_k}\right) \cdot 100 \quad (3.6)$$

de je  $A_u$  izmerena apsorbanca uzorka,  $A_b$  izmerena apsorbanca uzorka sa metanolom, tzv. blank i  $A_k$  je izmerena apsorbanca slepe probe (metanol i rastvor DPPH). Antioksidativna aktivnost svih uzoraka urađena je u triplicatu. IC<sub>50</sub> vrednost, definisana kao koncentracija kiseline/estra potrebna da neutrališe 50% DPPH radikala ( $RCS=50\%$ ), pri prethodno definisanim eksperimentalnim uslovima, dobijena je računski iz zavisnosti između vrednosti RSC (%) i koncentracije fenolne kiseline/estra.

### 3.1.3.13 Određivanje antioksidativnih osobina estara metodom ciklične voltametrije

Eksperiment su izvedeni u tro-elektrodnoj elektrohemijskoj ćeliji na sobnoj temperaturi. Staklena ugljenična elektroda je korišćena kao standardna, platinasta elektroda je korišćena kao kontra, dok je zasićena kalomelova elektroda korišćena kao referentna (slika 3.3). Pre ispitivanja, radna elektroda je polirana 0,05  $\mu\text{m}$  suspenzijom aluminjuma i zatim dva puta ispirana destilovanom vodom. Ciklični voltamogrami su snimljeni pri brzini promene potencijala od 50 mV/s, počevši od potencijala otvorenog kola od 2,0 V (za cimetnu kiselinu) i 1,2 V (za etil-cinamt). Eksperimenti su izvedeni na SP-200 (BioLogic Science Instruments) potenciometru/galvanometru.



Slika 3.3. Šematski prikaz aparature za cikličnu voltametriju (1-radna elektroda; 2-pomoćna elektroda; 3-referentna elektroda).

### 3.1.3.14 Određivanje antikoagulacionih osobina estara fenolnih kiselina

Za određivanje antikoagulacione aktivnosti jedinjenja koristi se krvna plazma bez trombocita (platelet poor plasma, PPP), koja se dobija nakon što se sveža citrirana krv centrifugira 15 min na 1500 o/min [152]. U mikrotitarskoj ploči se pomeša 0,05  $\text{cm}^3$  ovako pripremljene plazme sa 0,05  $\text{cm}^3$  uzorka estera različitih koncentracija pripremljenih u 10  $\text{mmol/dm}^3$  HEPES puferu sa 0,15  $\text{mol/dm}^3$  NaCl pH 7.4. Nakon toga se multikanalnom pipetom u sve uzorka doda 0,05  $\text{cm}^3$  rastvora  $\text{CaCl}_2$  zagrejanog na 37°C i odmah se meri apsorbanca na 670 nm [153, 154]. Merenje se nastavlja na svaki minut u narednih pola sata. Oštar porast apsorbanca nakon lag faze ukazuje na zgrušavanje krvi. Merenje se vrši u odnosu na radni pufer.

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je razvoj efikasnog enzimskog postupka za proizvodnju lipofilnih antioksidanasa, estara fenolnih kiselina. Da bi se ostvario ovaj cilj, neophodno je izvršiti optimizaciju procesnih parametara koji uključuju: izbor odgovarajućeg biokatalizatora i reakcionog medijuma, početne koncentracije supstrata, biokatalizatora i vode, temperature i vremena reakcije.

### 4.1 Uticaj vrste biokatalizatora i prirode acil donora na prinos reakcije esterifikacije

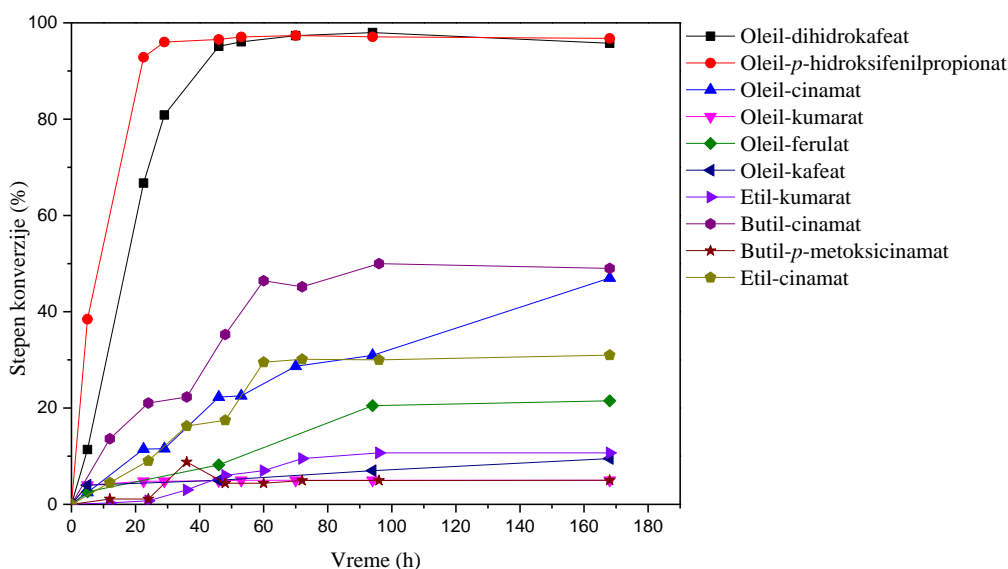
#### 4.1.1 Izbor odgovarajućeg enzimskog preparata za sintezu estara fenolnih kiselina

Kako je cena enzimskog preparata najčešće ograničavajući faktor u industrijskoj primeni enzimskih procesa, izbor odgovarajućeg enzima, kao i optimizacija početne koncentracije enzima su od izuzetne važnosti u svakoj enzimski katalizovanoj reakciji. Na osnovu literaturnih podataka može se zaključiti da se u sintezi estara fenolnih kiselina gotovo isključivo koriste tri komercijalna imobilisana preparata poput Lipozyme RM IM 20, Lipozyme TL IM i Novozyme 435 (tabela 2.4).

Prvi korak u optimizaciji sinteze estara fenolnih kiselina činio je izbor između dva komercijalna preparata Lipozyme RM IM i Novozyme 435. Da bi se odabrao odgovarajući enzim u početnim ispitivanjima je izvršena sinteza alifatičnih estara različitih fenolnih kiselina. Naime, struktura fenolne kiseline, tj. priroda supstituenata na aromatičnom jezgru utiče na specifičnost enzima, pa je radi odabira adekvatnog enzimskog preparata za sintezu lipofilnih antioksidanasa neophodno ispitati uticaj različitih acil donora na ispitivane enzime.

Kao reakcioni medijum korišćen je izooktan, dok je početna koncentracija odgovarajuće fenolne kiseline (cimetne, *p*-metoksicimetne, *p*-kumarinske, dihidrokafene, *p*-hidroksifenilpropionske) iznosila 0,167 mol/dm<sup>3</sup>, molski odnos supstrata 1:15 (n(kis): n(alk)), koncentracija biokatalizatora 15 mg/ml i temperatura 55°C. U eksperimentima u kojima su ferulna i kafena kiselina korišćene kao acil donori, početna koncentracija fenolne kiseline bila je 20 mmol/dm<sup>3</sup> zbog njihove male rastvorljivosti.

Sa slike 4.1 se vidi da stepeni konverzije dobijeni u sintezi različitih alifatičnih estara fenolnih kiselina variraju u opsegu od 5-98%. Lako se uočava da sinteza oleil estara: *p*-hidroksifenilpropionske, dihidrokafene i ferulne kiseline ima isti trend, samo je pomerenom vreme postizanja maksimalnog stepena konverzije, a koje za pomenute kiseline iznosi 20, 40 i 96 h, respektivno. Takođe se uočava da sintezu estara cimetine kiseline karakteriše period u kom dolazi do smanjenja brzine reakcije u odnosu na početnu brzinu. Ovaj period najkraće traje u sintezi oleil-cinamata od 23-29 h, dok se u sintezi etil- i butil-cinamata pad brzina dešava između 36-48 h, odnosno 24-36 h. Nakon ovog perioda dolazi do poraste brzine reakcije koja dostiže vrednost početne brzine. Nakon dostizanja maksimalnog stepena konverzije produženje reakcionog vremena gotovo kod svih estara dovodi do blagog pada stepena konverzije. Sličan trend uočen je u reakciji acidolize ulja riblje jetre sa dihidroksifenilsirćetnom kiselinom, kao i u sintezi linoleil-dihidrokafeata [86, 96].

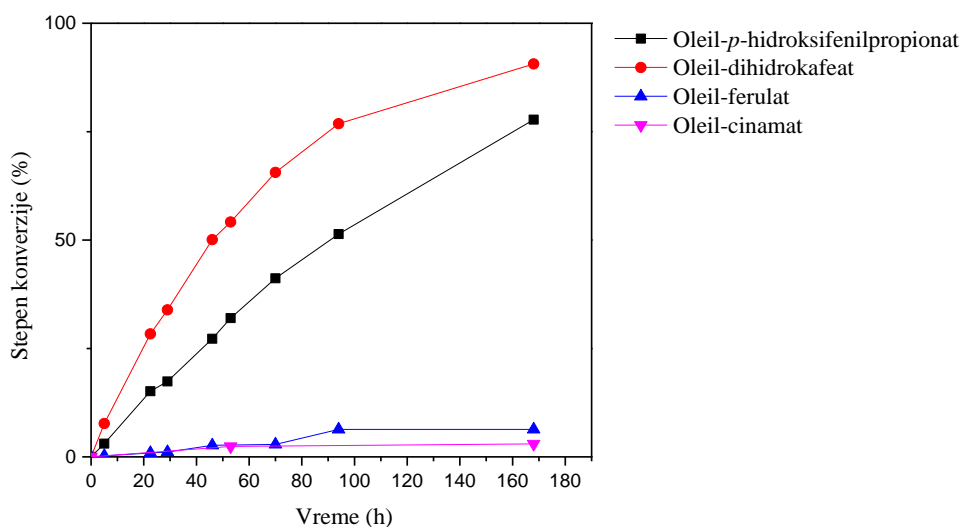


Slika 4.1. Uticaj strukture acil donora na stepen konverzije sa Novozyme 435

S druge strane u reakcijama katalizovanim sa Lipozyme RM IM (slika 4.2) stepen konverzije je u stalnom porastu sve vreme trajanja reakcije u sintezi oleil-*p*-hidroksifenilpropionata i oleil-dihidrokafeata, dok se u sintezi oleil-cinamata i oleil-ferulata plato postiže nakon 96, odnosno 53 h. U sintezi oleil-*p*-kumarata su dobijeni zanemarljivi stepeni konverzije i nakon 7 dana reakcije. U sintezi linoleil-dihidrokafeata, oktil-*p*-hidroksifenilpropionata, kao i u sintezi fenolnih lipida iz ulja riblje jetre i dihidroksifenilsirćetne kiseline takođe je uočen konstantan rast stepena konverzije [78,



86, 96], dok je u reakciji između etil-ferulata i monostearina reakcija ušla u ravnotežno stanje nakon samo 12 h [32].



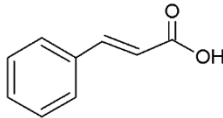
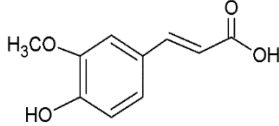
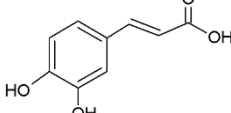
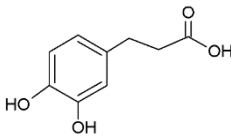
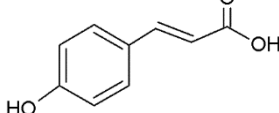
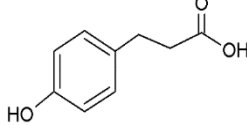
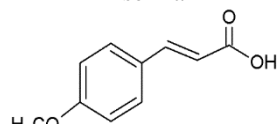
Slika 4.2. Uticaj strukture acil donora na stepen konverzije sa Lipozyme RM IM.

Može se zaključiti da se za 7 dana, koliko je trajala svaka od reakcija, Novozyme 435 pokazao kao superioran biokatalizator u odnosu na Lipozyme RM IM za svaki od sintetisanih estara. Jedino su u sintezi oleil-*p*-hidroksifenilpropionata i oleil-dihidrokafeata postignuti zadovoljavajući stepeni konverzije sa Lipozyme RM IM, međutim reakcija je i dalje dosta spora u odnosu na reakciju katalizovanu sa Novozyme 435, što se može zaključiti upoređivanjem početnih brzina reakcije (Tabela 4.1).

Pregledom rezultata prikazanih u tabeli 4.1 vidi se da su reakcije sinteze oleil-*p*-hidroksifenilpropionata i oleil-dihidrokafeata pet, odnosno četiri puta brže sa Novozyme 435 u odnosu na Lipozyme RM IM. Stamatis i saradnici su u sintezi oktil-*p*-hidroksifenilpropionata stigli do sličnih zaključaka. Naime sa Lipozyme RM IM je ostvaren solidan stepen konverzije od 57%, ali je enzimska aktivnost od 0,45 IU/g enzima bila približno 10 puta manja od one postignute sa Novozyme 435 4,63 IU/g enzima [78]. Esterifikaciona aktivnost dobijena u ovom eksperimentu za oleil-*p*-hidroksifenilpropionat iznosi 7,66 IU/g enzima sa Novozyme 435, odnosno 2,57 IU/g enzima sa Lipozyme RM IM.

Razlika u katalitičkoj aktivnosti ova dva imobilisana preparata potiče od razlike u afinitetu enzima prema ispitanim fenolnim supstratima, ali i od prirode nosača na koji su imobilisani, kao i od sadržaja vode u imobilisanom preparatu [77, 96].

Tabela 4.1. Početne brzine esterifikacije fenolnih kiselina sa Novozyme 435 i Lipozyme RM IM.

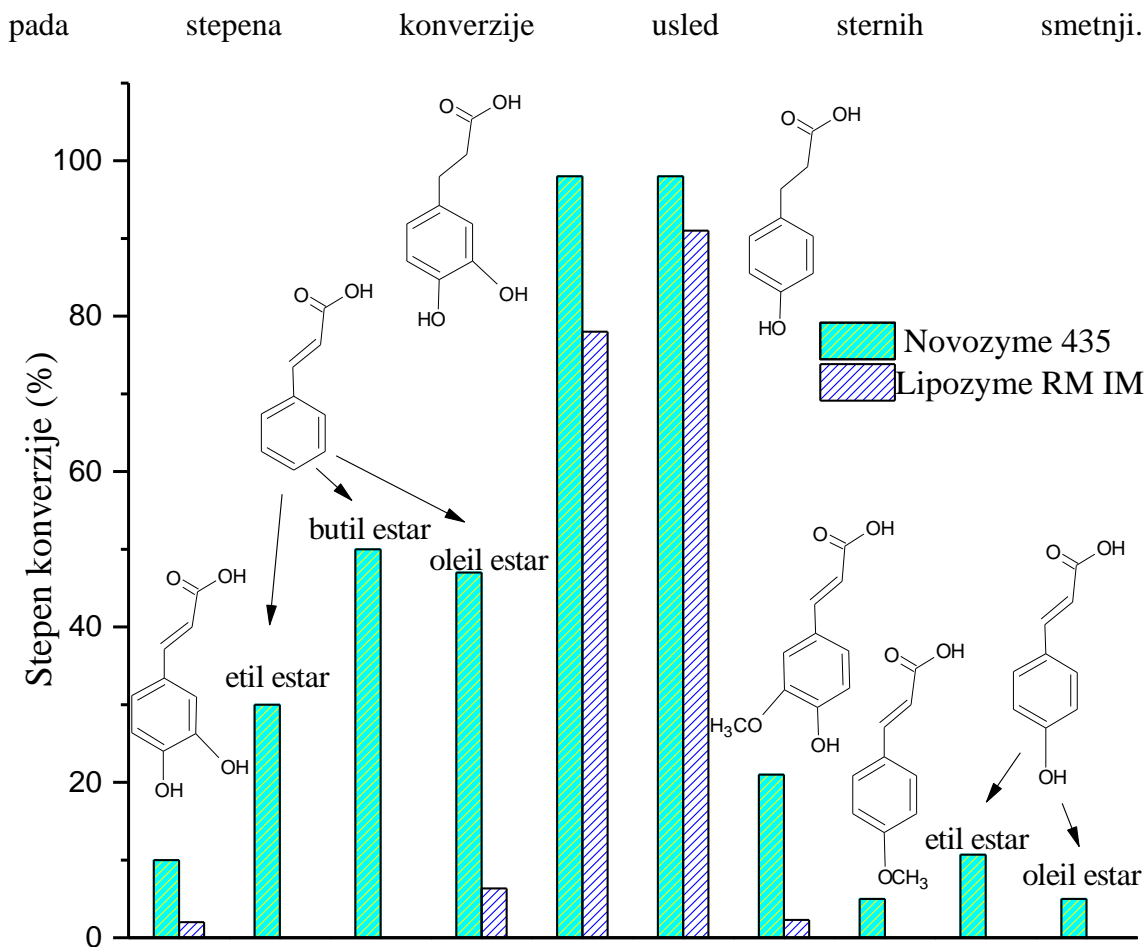
Vrsta Acil donora	Novozyme 435		Lipozyme RM IM	
	Acil akceptor	Početna brzina reakcije (mmol/dm <sup>3</sup> /h)	Acil akceptor	Početna brzina reakcije (mmol/dm <sup>3</sup> /h)
 Cimetna kiselina	Etanol	0,820		
	Butanol	1,450	Oleil alkohol	0,211
	Oleil alkohol	0,851		
 Ferulna kiselina	Oleil alkohol	0,105	Oleil alkohol	0,014
 Kafena kiselina	Oleil alkohol	0,042	Oleil alkohol	n.d.
 Dihidrokafeina kiselina	Oleil alkohol	4,952	Oleil alkohol	1,122
 p-Kumarinska kiselina	Etanol	0,224		
	Oleil alkohol	1,360	Oleil alkohol	n.d.
 p-Hidroksifenilpropionska kiselina	Oleil alkohol	12,850	Oleil alkohol	2,569
 p-Metoksicimetna kiselina	Butanol	0,232		

Kako su oba pomenuta preparata komercijalni imobilisani enzimi čija je cena najčešći ograničavajući faktor u komercijalnoj primeni enzimski sintetisanih lipofilnih antioksidanasa, kao nov cilj se postavlja pronalaženje novih enzima koji bi mogli da sintetišu estre fenolnih kiselina. Imajući to u vidu u ovom radu je ispitana esterifikaciona aktivnost nekoliko lipaza izolovanih na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, i to lipaze iz *P. aeruginosa* san-ai, *P.putida* B21, *R. oryzae* i *A. niger*

[155]. Esterifikaciona aktivnost pomenutih lipaza prema cimetnoj kiselini ispitana je nakon prečišćavanja i liofilizacije. Takođe, mogućnost esterifikacije cimetne kiseline ispitana je i sa dve slobodne komercijalne lipaze, i to lipazom iz *C.rugosa* i lipazom iz svinjskog pankreasa, ali ni u jednom slučaju nisu detektovani proizvodi nakon tri dana reakcije.

#### 4.1.2 **Određivanje specifičnosti CALB i RLM prema acil donorima sa različitim supstituentima na aromatičnom prstenu**

Različita priroda i položaj supstituenata na aromatičnom prstenu, kao i dužina i stepen zasićenosti/nezasićenosti bočnog niza, direktno utiču na stepen konverzije u reakciji esterifikacije fenolnih kiselina. Iz tabele 4.1 i sa Slika 4.1-4.3 se može videti da je najveći stepen konverzije, nezavisno od primenjenog enzima, ostvaren kada je *p*-hidroksifenilpropionska kiselina korišćena kao supstrat. Sa ovom kiselinom je nakon samo 22,5 h ostvaren stepen konverzije od 93% sa Novozyme 435 i 90% za 168 h sa Lipozyme RM IM. Za isto vreme (22,5, odnosno 168 h) je sa dihidrokafenom kiselinom ostvaren prinos od 67% sa Novozyme 435 i 78% za Lipozyme RM IM. Struktura ove dve kiseline se razlikuje za jednu hidroksilnu grupu u položaju tri na aromatičnom prstenu (tabela 4.1) tako da se nešto manji stepen konverzije sa dihidrokafenom kiselinom može pripisati sternim smetnjama prouzrokovanim dodatnom hidroksilnom grupom. Kompjuterskim modelovanjem reakcija sinteze aromatičnih estara glukoze, Oto i saradnici su došli do zaključka da je fenilpropionska kiselina jedan od boljih acil donora za ovu reakciju, kao i da hidroksilovanje u *para* i *meta* položaju ne utiče na smanjenje stepena konverzije. Naime, autori tvrde da je hidrofobni džep aktivnog centra CALB dovoljno širok da se izbegnu neželjene sterne smetnje usled postojanja hidroksilnih grupa u *para* ili *meta* položaju [156]. Međutim, nije ispitan uticaj supstrata sa dve hidroksilne grupe u *para* i *meta* položaju koji prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji dovodi do



Slika 4.3. Uticaj strukture fenolne kiseline na stepen konverzije sa Novozyme 435 i Lipozyme RM IM.

Kao što se vidi na slici 4.3, nešto niži stepeni konverzije sa Novozyme 435 ostvareni su u reakcijama esterifikacije u kojima je cimetna kiselina korišćena kao acil donor. Ovakav rezultat ukazuje na inhibitorski efekat dvostruke veze na bočnom lancu konjugovane sa aromatičnim prstenom. Razlog je najverovatnije krutost *trans* dvostruke veze konjugovane sa aromatičnim prstenom, što rezultira slabijim vezivanjem supstrata za aktivni centar [104]. Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da stepen konverzije cimetine kiseline sa Novozyme 435 zavisi od vrste acil akceptora, kao i da je najveći stepen konverzije ostvaren sa butanolom, 50%, što je u skladu sa ispitivanjima dobijenim u studiji koju su sproveli Gijot i saradnici [76]. U skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, pomenuta grupa autora je dobila znatno veći stepen konverzije u reakciji sinteze oleil-dihidrokafeata, 90% u poređenju sa stepenom konverzije oleil-cinamata koji je iznosio 56% [76]. Sličan inhibitorski efekat dvostruke veze konjugovane sa aromatičnim prstenom potvrđen je i u sintezi oktil estara *p*-hidroksifenilpropionske kiseline i cimetine

kiseline [78]. S druge strane Sorour i saradnici su u reakciji sinteze fenolnih lipida koristeći laneno ulje, došli do zaključka da je cimetne kiseline bolji acil donor u odnosu na dihidrokafenu kiselinu [85].

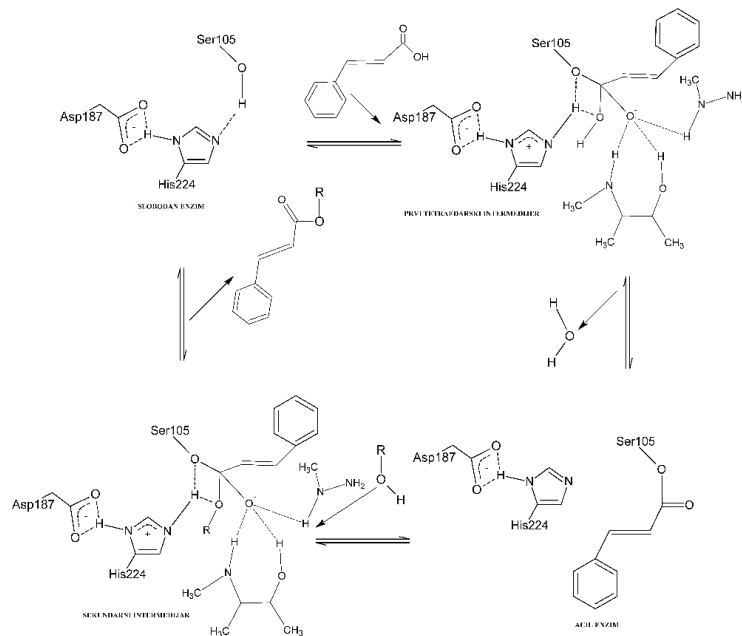
Rezultati dobijeni prilikom esterifikacije cimetne kiseline sa oleil alkoholom katalizovanom sa Lipozyme RM IM, ukazuju na postojanje istog inhibitornog efekta kao kod Novozyme 435, s tim što je efekat inhibicije znatno više izražen, što se vidi iz ostvarenog stepena konverzije koji je nakon 7 dana iznosio svega 7%. Suprotno našem zapažanju, Stamatis i saradnici su prilikom sinteze oktil estara fenolnih kiselina dobili gotovo isti stepen konverzije sa cimetnom kiselinom kao sa *p*-hidroksifenilpropionskom kiselinom u sistemu bez rastvarača [78]. Razlog ovakvih protivurečnosti sa literaturnim podacima može biti u različitim reakcionim uslovima, naime priroda reakcionog medijuma utiče na mikrovodeni sloj enzima [120], a s druge strane broj molekula vode u aktivnom "džepu" direktno utiče na specifičnost CALB [62].

Postojanje metoksi i hidroksilne grupe u *para* položaju na aromatičnom prstenu dovodi do drastičnog pada u ostvarenom stepenu konverzije u poređenju sa nesupstituisanom cimetnom kiselinom. Ovakav rezultat može se objasniti inhibitornim delovanjem elektron donorskih grupa u *para* položaju na prstenu koje deaktiviraju elektrofilni ugljenikov atom karboksilne grupe za nukleofilni napad na alkohol (Slika 4.4). Rezultati dobijeni sa *p*-hidroksifenilpropionskom kiselinom ukazuju da je sterna efekat zanemarljiv u odnosu na elektronski, jer hidroksilna grupa u *para* položaju u slučaju kada nije konjugovana sa dvostrukom vezom u bočnom nizu nije prouzrokovala inhibiciju enzima. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim u nekoliko odvojenih istraživanja sinteze estara fenolnih kiselina [92, 157]. Suprotno našem zapažanju Stivenson i saradnici su u sintezi estara feniletanola dobili dobre stepene konverzije sa *p*-metoksicimetnom kiselinom [124]. Slično, Li i saradnici su u visokom prinosu sintetisali oktil-*p*-metoksicinamat u izooktanu na temperaturi od 75°C [158]. Različiti efekti metoksi i hidroksilne grupe u *para* položaju na aromatičnom prstenu mogu biti prouzrokovani različitim intenzitetom negativnog induktivnog efekta ovih grupa, koji za razliku od pozitivnog rezonantnog efekta utiče na povećanje pozitivnog naelektrisanja na ugljeniku karbonilne grupe. Takođe, neki izvori navode da je elektron-donorski efekat metoksi grupe manje izražen u odnosu na elektron-donorski efekat hidroksilne grupe, pa je moguće da na taj način metoksi grupa inhibira enzim u manjoj meri u odnosu na

hidroksilnu grupu [159]. Na kraju razlog ovakve protivurečnosti literaturnih podataka i rezultata dobijenih u ovoj studiji, može da ukaže na pogrešan izbor reakcionih uslova za ovu esterifikaciju. Naime, pokazalo se da uticaj metoksi grupe zavisi u mnogome od drugih supstituenata na prstenu [92], kao i od reakcionih uslova [76], pa se detaljnom optimizacijom procesnih parametara pre svega izborom acil akceptora i reakcionog medijuma može uticati na povećanje prinosa esterifikacije.

Slično, rezultati dobijeni sa lipazom iz *R. miehei* ukazuju na postojanje istog inhibitorynog efekata kao kod CALB, s obzirom da je prinos sa *p*-kumarinskom kiselinom i oleil alkoholom zanemarljiv.

Uvođenje dodatne hidroksilne grupe u položaju tri aromatičnog prstena dovodi do potpune inhibicije Novozyme 435, a slično je i sa Lipozyme RM IM, što se vidi iz stepena konverzije ostvarenog sa kafenom kiselinom. Jači uticaj elektronskog efekta na inhibiciju primenjene lipaze u odnosu na sterni efekat primećuje se i kada se uporede stepeni konverzije dobijeni sa kafenom i dihidrokafenom kiselinom. Slično kao i sa kafenom kiselinom, i u slučaju ferulne kiseline, koja umesto hidroksilne grupe u *meta* položaju ima metoksi grupu, ostvareni stepeni konverzije su manji nego sa nesupstituisanom cimetcnom kiselinom, ali veći nego sa kafenom. Do sličnih rezultata došli su i drugi istraživači, međutim stepen inhibicije lipaze prouzrokovan dodatnim supstituentima na prstenu zavisio je dosta od reakcionih uslova i vrste acil akceptora. Karbone je pokazao da stepen konverzije reakcije acidolize lanenog ulja raste kada se jedna hidroksilna grupa kafene kiseline zameni sa metoksi grupom, slično kao u ovoj disertaciji, međutim zamena obe hidroksilne grupe metoksi grupama (dimetoksicimetcna kiselina) dovela je do pada stepena konverzije [92]. Sličan trend ostvaren je u reakciji esterifikacije fenolnih kiselina feniletanolom s izuzetkom dimetoksicimetcne kiseline s kojom je dobijen dobar stepen konverzije [88, 124]. S druge strane, u reakciji esterifikacije kafene kiseline različitim alifatičnim alkoholima ostvaren je bolji stepen konverzije nego sa ferulnom kiselinom [105].



Slika 4.4. Prikaz mehanizama reakcije sinteze estara fenolne kiseline na primeru cimetne kiseline.

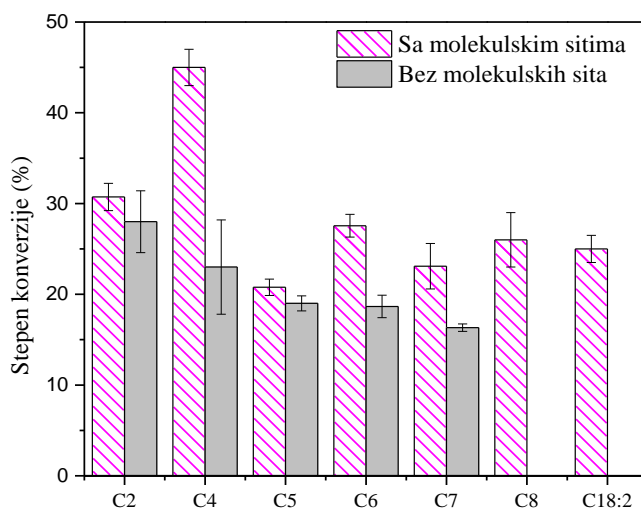
## 4.2 Optimizacija enzimske sinteze estara cimetne kiseline

Cimetna kiselina se koristi u prehrambenoj industriji kao modifikator ukusa i mirisa, iako je njena primarna uloga u proizvodnji metil-, etil-, benzil- estara koji se koriste u industriji parfema. Međutim, zahvaljujući nizu dokazanih fizioloških osobina koje uključuju: antioksidativnu, antikancerogenu, antitrombocitnu, antimalaričnu i depigmentizacionu aktivnost, gastro-protektivni efekat i hipoglicemijski efekat [160-167], poraslo je interesovanje za primenu cimetne kiseline i njenih derivata kao potencijalnih dijetetskih suplemenata i konzervanasa. Esterifikacija cimetne kiseline ima za cilj dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta sa povoljnim biološkim funkcijama. S druge strane povećava se mogućnost primene cimetne kiseline u uljanim formulacijama, jer se uvođenjem alifatičnog ugljeničnog niza, povećava njena rastvorljivost u nepolarnim sredinama.

#### 4.2.1 Uticaj vrste acil akceptora na stepen konverzije cimetine kiseline

S ciljem povećanja rastvorljivosti cimetine kiseline u nepolarnim sredinama, izvedena je sinteza različitih estara cimetine kiseline, gde su kao acil akceptori korišćeni zasićeni alifatični alkoholi sa 2-8 ugljenikovih atoma, kao i nezasićeni oleil alkohol. Sintetisanim estrima je određena antioksidativna aktivnost pomoću DPPH metode. Reakcije su izvedene u izooktanu pri koncentraciji cimetine kiseline od  $0,167 \text{ mol/dm}^3$ , koncentraciji alkohola od  $2,51 \text{ mol/dm}^3$  na  $55^\circ\text{C}$  i  $250 \text{ o/min}$ .

Sa slike 4.5. se vidi da su najveći stepeni konverzije, postignuti kada su kao alkoholni supstrati korišćeni alkoholi sa kratkim ugljeničnim nizom, butanol i etanol. Sa porastom dužine ugljovodoničnog lanca alifatičnog alkohola, može se reći, da prinos estara cimetine kiseline opada, ali ne u velikoj meri. Dakle, Novozyme 435 pokazuje veliki afinitet prema butanolu što je u skladu sa literaturnim podacima [76, 104]. Pošto alkoholi ne učestvuju u procesu stvaranja acil-enzim intermedijera i brzina reakcije esterifikacije uglavnom zavisi od difuzije molekula alkohola u rastvoru, manji molekuli etanola i butanola će lakše prići aktivnom centru enzima nego molekuli viših alkohola. Pored toga, mnogi naučnici na osnovu strukture aktivnog centra CALB smatraju da su kraći alkoholi bolji supstrati za lipazu B jer se mogu komotno smestiti u šupljinu oko aktivnog centra koja se sužava i ima oblik levka [168]. Kasani i saradnici su u sintezi estara cimetine kiseline pokazali da dužina alifatičnog alkohola ne utiče bitno na stepen konverzije, ali slično kao i u našem istraživanju nešto veći stepeni konverzije ostvareni su sa alkoholima kraćeg ugljeničnog niza [112].



Slika 4.5. Uticaj dužine ugljeničnog niza acil akceptora na stepen konverzije cimetine kiseline.



Do sličnih rezultata došli su i Katsoura i saradnici u sintezi estara ferulne kiseline [88]. Razlog većeg stepena konverzije ostvarenog u butanolu u odnosu na više alkohole, može biti i u polarnosti reakcione smeše tj. boljoj rastvorljivosti cimetne kiseline u smeši izookatana i butanola u odnosu na više alkohole. Naime, poznato je da se fenolne kiseline loše rastvaraju u nepolarnim sredinama, tako da veći udeo polarnog supstrata u reakcionoj smeši može da dovede do povećanja brzine reakcije zahvaljujući boljem rastvaranju supstrata. Iako bi se očekivalo da stepen konverzije bude još veći u slučaju kada je etanol acil akceptor, veliki višak etanola može da dovede do inhibicije enzima, kao što potvrđuju literaturni podaci [76]. Naime, etanol koji je potpuno mešljiv sa vodom može da dovede do narušavanja mikrovodenog sloja neophodnog za održavanje native konformacije enzima.

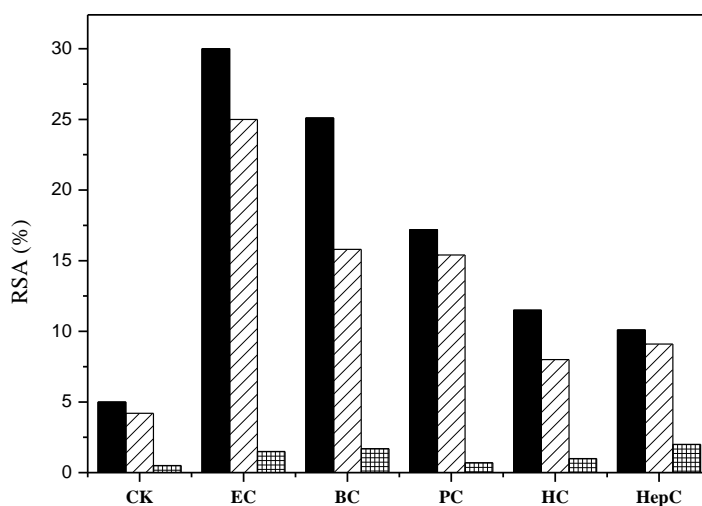
Koncentracija vode u reakcionoj smeši je bitan parametar koji u reakcijama esterifikacije utiče na aktivnost enzima, kao i na konstantu ravnoteže reakcije. Naime, za enzimsku aktivnost je neophodna mala količina vode neophodna da se održi nativna konformacija enzima, dok s druge strane pri većim sadržajima vode dolazi do pomeranje ravnoteže reakcije ka hidrolizi estera usled zakona o dejstvu masa. Takođe veće koncentracije vode dovode do inaktivacije enzima usled veće fleksibilnosti trodimenzionalne konformacije molekula [169]. Dodavanje molekulskih sita u rastvarač i alkoholne supstrate pre izvođenja reakcija sinteze estara je imalo povoljan efekat na ostvarene stepene konverzije, kao što se vidi na slici 4.5.

Molekulska sita su mikroporozne supstance sačinjene od kristalnih alumino-silikata koji pripadaju klasi zeolita. Ove supstance je moguće potpuno osušiti bez promene njihove kristalne strukture. Veličina pora varira od 0,3-1 nm u zavisnosti od tipa katjona koji formira elektrostatičke interakcije sa osnovom rešetke. Razdvajanje molekula se vrši na osnovu polarnosti i veličine molekula, pa su zato jako dobri adsorbensi za odvajanje vode od jedinjenja veće molekulske mase. Za razdvajanje molekula vode od etanola, neophodno je koristiti molekulska sita sa veličinom pora od 0,3 nm. Kako je osnovna pogonska sila adsorpcije polarna unutrašnjost pora, molekuli vode čije je prečnik 0,275 nm bivaju adsorbovani u pore, dok etanol čiji je prečnik molekula 0,32 nm ostaje van molekulskog sita. Slično je i sa ostalim alkoholnim supstratima veće molekulske mase, pa su za izvođenje ovog eksperimenta korišćena molekulska sita veličine pora 0,3 nm.

Iz dobijenih rezultata se vidi da su za aktivnost Novozyme 435 neophodne minimalne količine vode. Kako sam imobilisani preparat sadrži 1,4% vode [170], čini se da je ta koncentracija dovoljna da se održi nativna konformacija enzima. Literaturni podaci ukazuju na sličnu toleranciju Novozyme 435 na sredine sa malom  $a_w$  [169, 171]. Pored uticaja vode na trodimenzionalnu konformaciju enzima, u literaturi se inaktivacija Novozyme 435 usled viška vode pripisuje i fizičkom efektu, jer dolazi do aglomeracije enzima [169, 172].

#### 4.2.1.1 Antioksidativne osobine estara cimetne kiseline

Antioksidativna aktivnost estara cimetne kiseline ispitana je pomoću DPPH metode. Reakcija fenolnih kiselina sa molekulom DPPH odvija se putem dva mehanizma i to: HAT ili ET mehanizma [173]. Međutim, u slučaju cimetne kiseline koja nema supstituente na benzenovom prstenu reakcija sa DPPH se odvija preko HAT mehanizma. Kao što se vidi na slici 4.6, antioksidativna aktivnost cimetne kiseline je zanemarljiva, što je u skladu sa literaturnim podacima [116, 173, 174]. Vidi se da se esterifikacijom cimetne kiseline pozitivno utiče na antioksidativnu aktivnost, međutim dobijeni estri i dalje imaju jako malu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa drugim fenolnim kiselinama poput ferulne kiseline.

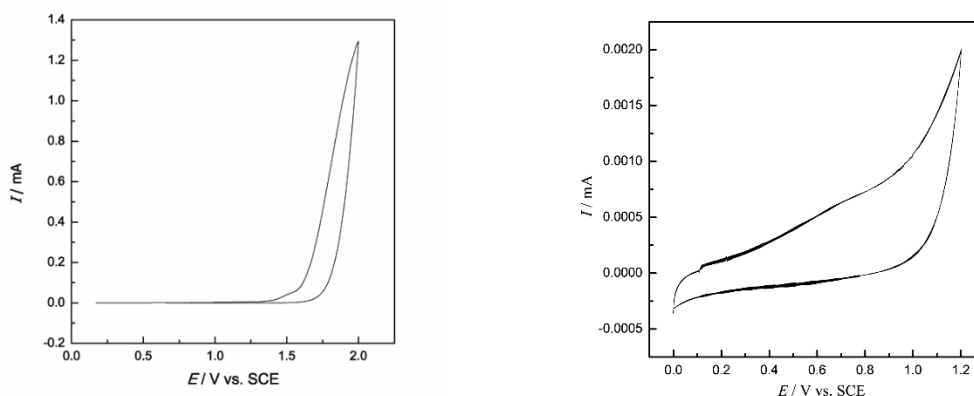


Slika 4.6. Antioksidativna aktivnost estara cimetne kiseline.

Porast antioksidativne aktivnosti estara u poređenju sa kiselinom je najverovatnije posledica zamene H iz karboksilne grupe sa alkil grupama. Alkil grupe mogu induktivno da doniraju elektrone benzenovom prstenu, čime se povećava reaktivnost benzenovog

prstena prema elektrofilnoj supstituciji, pa se tako esterifikacijom povećava reaktivnost benzenovog prstena prema HAT reakcijama [173]. Interesantno je da nije bilo moguće odrediti antioksidativnu aktivnost oleil i oktil estra cimetne kiseline, jer je uzorak pokazivao veću apsorbancu od DPPH kontrole. Slični problemi u eksperimentalnom radu su zabeleženi i u drugim istraživanjima [173]. Kako se pokazalo da je etil-cinamat najbolji antioksidans od svih sintetisanih estara cimetne kiseline, u nastavku je antioksidativna aktivnost ovog estra ispitana i metodom ciklične voltametrije.

Kao što se vidi na slici 4.7, nije došlo do oksidacije cimetne kiseline, jer nema primetnog anodnog pika, što je u skladu sa literaturom [175]. S druge strane, na cikličnom voltamogramu etil-cinamata je moguće uočiti proces oksidacije sa širokim anodnim pikom na  $E_a$  0,7 V. Međutim, anodni pik je na višem potencijalu od uobičajenog za dobre antioksidanse ( $E_a < 0,45$ ) [175], pa su cikličnom voltametrijom samo potvrđeni rezultati dobijeni DPPH metodom. Naime, esterifikacijom cimetne kiseline dolazi do poboljšanja antioksidativnih svojstava estara, ali su estri cimetne kiseline i dalje loši antioksidansi.

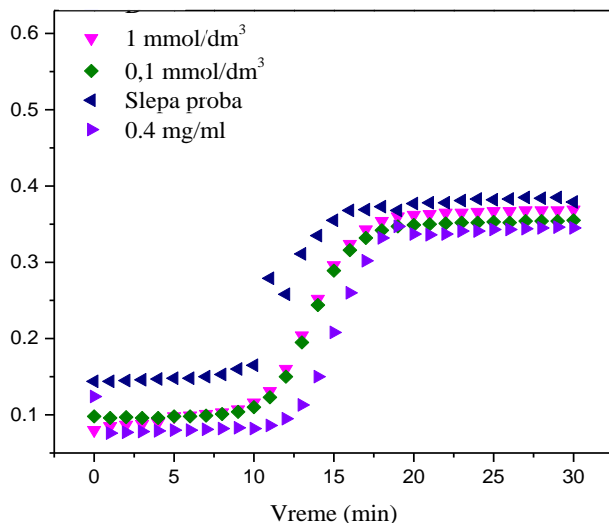


Slika 4.7. Ciklični voltamogram cimetne kiseline i etil-cinamata.

#### 4.2.1.2 Antikoagulaciona aktivnost etil-cinamata

Kalcijum je jedan od glavnih faktora zgrušavanja krvi unutrašnjim putevima. Korišćenjem rekalcifikacione tehnike moguće je odrediti antikoagulacione osobine određenih jedinjenja, što je u ovoj disertaciji i urađeno korišćenjem etil-cinamata. Kao što se vidi na slici 4.8, krv koaguliše od 11-15 min. Dodavanjem etil-cinamata dolazi do blagog pomeranja vremena koagulacije, koja se sa ovim uzorcima završava na 17 min. Ljubičastom bojom je predstavljena koagulacija krvi u prisustvu 0,4 mg/ml aspirina, vidi se da se koagulacija u ovom slučaju završava u isto vreme kao i sa etil-cinamatom.

Međutim, kao zaključak može da se izvede da etil-cinamat poseduje jako slaba antikoagulaciona svojstva, jer u slučaju jakih antikoagulanasa koagulacije ne počinje ni nakon 30 min eksperimenta [154].



Slika 4.8. Rekalcifikacioni dijagram za etil- cinamat.

#### 4.2.2 Uticaj reakcionog medijuma na stepen konverzije cimetine kiseline

Uticaj vrste organskog rastvarača na sintezu etil- i butil-cinamata ispitan je izvođenjem reakcije u širokom opsegu  $\log P$  vrednosti rastvarača, od  $\log P = -0,23$  do  $\log P = 8,8$ . Reakcije su izvedene na  $55^{\circ}\text{C}$ , pri koncentraciji kiseline od  $0,167 \text{ mol/dm}^3$  i molskom odnosu od 1:15 (n(kis):n(alk)). Korišćeni rastvarači, njihove  $\log P$  vrednosti i dobijeni stepeni konverzije su prikazani u tabeli 4.2.

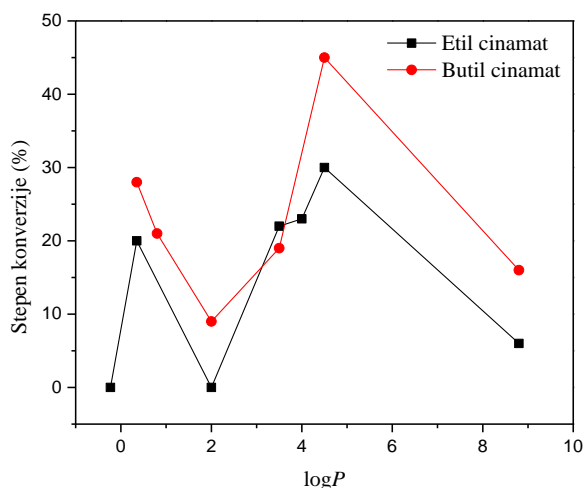
Iz dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 4.2, se jasno vidi da su najbolji rezultati postignuti kada su kao reakcioni medijum korišćeni nepolarni organski rastvarači. Slični rezultati su dobijeni u sintezi velikog broja estara fenolnih kiselina [90, 122, 158, 176]. Jedno od objašnjenja za ovakav rezultat je da je za odigravanje enzimske reakcije, neophodna mala količina vode oko enzima kako bi održao svoju nativnu konformaciju i aktivnost. Polarni rastvarači imaju veći kapacitet za apsorpciju vode od nepolarnih jer formiraju vodonične veze sa molekulima vode, pa se smatra da oni odvlače vodu sa enzima, narušavajući tako njegovu nativnu konformaciju [3, 177]. S druge strane nepolarni rastvarači dovode do hidrofobne hidratacije, kada nepolarne grupe rastvarača favorizuju interakcije između samih molekula vode, čime se voda "zamrzava" u klasterima oko hidrofobne površine [61].

Tabela 4.2. Zavisnost stepena konverzije cimetne kiseline od  $\log P$  vrednosti rastvarača.

Rastvarač	$\log P$	Stepen konverzije (%)	
		etil-cinamat	butil-cinamat
Aceton	-0,23	Tragovi	-
<i>terc</i> -butanol	0,35	20	28
<i>n</i> -Butanol	0,8	-	21
Hloroform	2,0	Tragovi	9
<i>n</i> -Heksan	3,5	22	19
<i>n</i> -Heptan	4,0	23	-
Izooktan	4,5	30	45
Heksadekan	8,8	6	16

Prilikom modelovanja strukture i fleksibilnosti molekula CALB u različitim rastvaračima, Trodler i Plajs su potvrdili razlike u efektima polarnih i nepolarnih rastvarača na površinski vezanu vodu CALB [61]. Pored uticaja rastvarača na vodu esencijalnu za aktivnost enzima, u pomenutoj studiji su pokazali da usled interakcija enzima i rastvarača fleksibilnost CALB u organskim rastvaračima opada sa povećanjem  $\log P$  vrednosti usled smanjenja hidrofилne površine enzima, čime se povećava stabilnost enzima jer dolazi do boljeg pakovanja aminokiselinskih ostataka [61].

Sa slike 4.9 se vidi da nezavisno od sintetisanog estera stepen konverzije pokazuje istu zavisnost od  $\log P$ -a, pri čemu su lako uočljiva dva maksimuma. Kontinuirani rast stepena konverzije sa porastom  $\log P$  vrednosti od 2-4,5 u skladu je sa istraživanjima Lanea i saradnika koji su istakli da su rastvarači sa  $\log P > 4$  bolji medijumi za enzimsku sintezu estara od hidrofилnih rastvarača [120]. Sličan trend uočen je u velikom broju enzimski katalizovanih sinteza estara [3, 169, 178, 179].



Slika 4.9. Uticaj  $\log P$ -a rastvarača na stepen konverzije estara cimetne kiseline.

Sa slike 4.9 se takođe uočava da sa smanjivanjem  $\log P$  vrednosti ispod 2 dolazi do rasta stepena konverzije koji dostiže maksimum kada se kao rastvarač koristi *tert*-butanol. Razlog ovakvog ponašanja najverovatnije je bolje rastvaranje supstrata, cimetne kiseline, u ovim rastvaračima čime se povećava njihova dostupnost enzimu, što za posledicu ima veću aktivnost enzima. Najmanji stepen konverzije ostvaren je u acetonu, što je u skladu sa drugim istraživanjima [176]. Interesantno je da je aceton dobar reakcioni medijum za sintezu lipofilnih askorbil estara sa Novozyme 435 [180]. Razlog ovolikog odstupanja u izboru optimalnog reakcionog medijuma pored rastvorljivosti supstrata može da bude posledica vode vezane u katalitičkom džepu molekula CALB koja utiče na afinitet enzima prema supstratu [180].

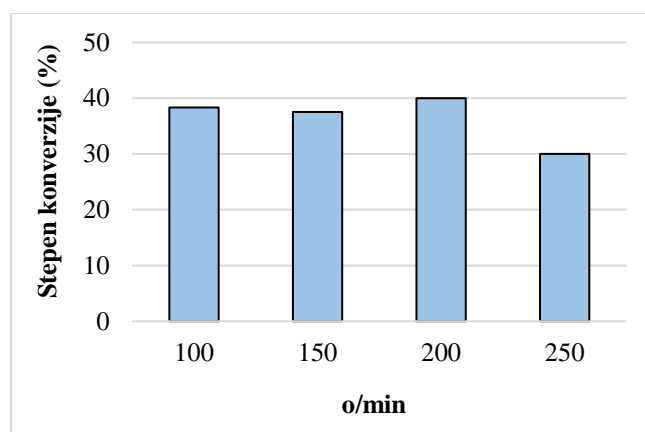
Na osnovu dobijenih rezultata izooktan je izabran kao optimalni reakcioni medijum i sve naredne reakcije sinteze estara cimetne kiseline su izvedene u ovom reakcionom medijumu.

### 4.2.3 Uticaj brzine mešanja na stepen konverzije cimetne kiseline

Kako se sinteza estara fenolnih kiselina odvija u heterogenom sistemu, od velikog je značaja naći uslove pod kojima dolazi do efikasnog prenosa mase uz minimalnu inaktivaciju enzima. Naime, s povećanjem brzine mešanja dolazi do smanjena graničnog sloja oko poroznih čestica enzima, čime se smanjuju difuzione limitacije, ali s druge strane, prevelike brzine mešanja mogu da dovedu do inaktivacije enzima usled velikih

tangencijalnih napona. Da bi se našao kompromis između ova dva protivurečna zahteva, sinteza etil-cinamata je ispitana u opsegu brzina mešanja od 100-250 o/min.

Sa slike 4.10 se vidi da sa porastom brzine mešanja stepen konverzije raste do 200 o/min najverovatnije usled smanjenja graničnog sloja oko enzima, odnosno smanjenja difuzionih limitacija. Dalji porast brzine mešanja dovodi do pada stepena konverzije.



Slika 4.10. Uticaj intenziteta mešanja na stepen konverzije

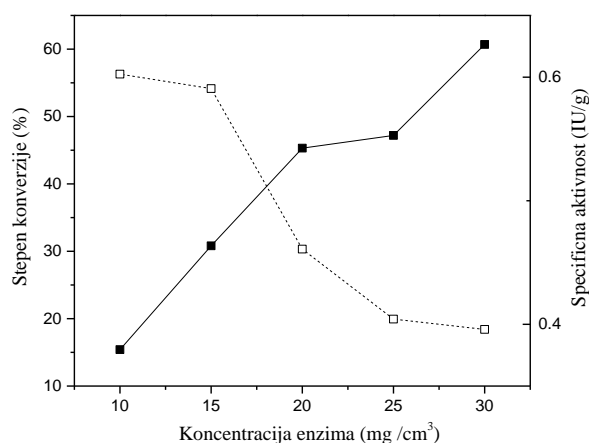
Ovakvi rezultati upućuju na moguću inaktivaciju enzima usled velikih tangencijalnih napona pri velikim brzinama mešanja što za posledicu ima pad stepena konverzije. Takođe, treba uzeti u obzir i postojanje tzv. “out of phase” uslova mešanja pri kojima tečnost u erlenmajeru ne cirkuliše u fazi za šejkerom pa većina tečnosti ostaje nepokretna na dnu erlenmajera [181, 182], čime se smanjuje efikasnost mešanja supstrata, ali se takođe smanjuje i kontakt enzima i supstrata. Neki autori ističu i da pri velikim brzinama mešanja čestice enzima bivaju rasute po reakcionom sudu pri čemu deo enzima ostaje bez vode esencijalne za enzimsku aktivnost, dok pri manjim brzinama mešanja ne dolazi do ovog fenomena, jer su čestice enzima u neposrednoj blizini pa dele dostupne molekule vode [179].

#### 4.2.4 Uticaj koncentracije enzima na stepen konverzije cimetne kiseline

Uticaj koncentracije enzima na stepen konverzije cimetne kiseline ispitano je u sintezi butil-cinamata. Reakcije su se odvijale u izooktanu pri koncentraciji kiseline od 0,17 mol/dm<sup>3</sup> kiseline i koncentraciji alkohola od 2,51 mol/dm<sup>3</sup>. Da bi se inicirala reakcija

sinteze estra u reakcionu smešu su dodate različite količine enzima od 50-150 mg, kojima odgovaraju koncentracije od 10-30 mg/cm<sup>3</sup>, odnosno 1-3 % (w/v).

Kao što se vidi sa slike 4.11 stepen konverzije raste sa porastom koncentracije enzima, i najveći stepen konverzije od 61 % ostvaren je pri najvećoj koncentraciji enzima od 30 mg/cm<sup>3</sup>. Ovakav trend je očekivan s obzirom da sa porastom koncentracije enzima raste stepen konverzije, jer se u reakcionoj smeši nalazi više aktivnih centara, čime se povećava verovatnoća stvaranja acil-enzim kompleksa, odnosno odvijanja enzimske reakcije. S porastom koncentracije enzima od 10-20 mg/cm<sup>3</sup> stepen konverzije raste gotovo linearno, a nakon toga dolazi do blagog usporavanja. Pri većim koncentracijama enzima dolazi do aglomeracije čestica enzima čime se smanjuje kontakt enzima i supstrata odnosno dolazi do lošijeg prenosa mase usled postojanja difuzionih limitacija.



*Slika 4.11. Zavisnost stepena konverzije butil-cinamata i specifične aktivnosti enzima od koncentracije enzima.*

Kako je cena enzima bitan faktor u oceni ukupne rentabilnosti procesa, pored stepena konverzije praćena je i specifična aktivnost enzima, koja u obzir uzima i potrošnju enzima. Naime, ideja je da se nađe minimalna količina enzima s kojom se dobijaju zadovoljavajuće količine estra. Sa slike 4.11 se vidi da zavisnost specifične aktivnosti enzima od koncentracije enzima ima potpuno drugačiji trend od stepena konverzije. Naime, najveća specifična aktivnost od 0,6 IU/g ostvarena je pri najmanjoj koncentraciji enzima od 10 mg/cm<sup>3</sup>, dok je s porastom koncentracije enzima do 30 mg/cm<sup>3</sup>, specifična aktivnost pala za gotovo 40%. S druge strane, pri koncentraciji enzima od 15 mg/ml, postignuta je nešto manja produktivnost, i duplo veći stepen konverzije, pa je ova



koncentracija enzima izabrana za dalju optimizaciju sinteze estara fenolnih kiselina. Smanjena efikasnost po jedinici mase enzima sa porastom koncentracije enzima zabeležena je i u drugim enzimskim sintezama fenolnih estara [32, 109]

Generalno se može zaključiti da su za esterifikaciju cimetne kiseline potrebne velike koncentracije enzima i dugo reakciono vreme, što ovaj proces čini manje interesantnim za industrijsku upotrebu. Rezultati dobijeni u drugim studijama potvrđuju ovu konstataciju, pa su tako Stamatis i saradnici ostvarili stepen konverzije od 82% za 12 dana sa 150 mg lipaze i koncentraciji kiseline od 100 mmol/dm<sup>3</sup>, odnosno E/S odnosu od 300 g/mol [78]. Slično, Buisman i saradnici su prijavili stepen konverzije od 85% za 5 dana u sintezi butil-cinamata pri E/S odnosu od 150 g/mol [104].

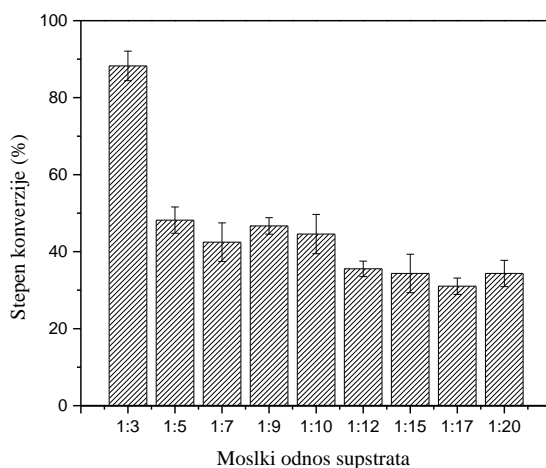
#### 4.2.5 Uticaj molskog odnosa na stepen konverzije cimetne kiseline

U cilju povećanja stepena konverzije etil-cinamata, reakcija esterifikacije je izvedena pri različitim molskim odnosima supstrata. Naime, kako je reakcija esterifikacije ravnotežna reakcija, povećanjem koncentracije supstrata može se uticati na ravnotežu reakcije usled delovanja Zakona o dejstvu masa. S druge strane, prevelika koncentracija supstrata može da dovede od inhibicije enzima supstratom, pa je neophodno naći optimalnu vrednost pri kojoj se nalazi kompromis između ova dva zahteva. Generalno se reakcije sinteze estara fenolnih kiselina izvode u višku acil akceptora, pa je varirana koncentracija alkohola [77, 92].

Uticaj početnog molskog odnosa kiseline i alkohola u reakcionoj smeši ispitan je variranjem koncentracije alkohola pri konstantnim vrednostima ostalih reakcionih parametara. Sve sinteze su izvedene u izooktanu na 55°C pri koncentraciji enzima od 15 mg/ml i koncentraciji kiseline od 0,167 mol/dm<sup>3</sup>. Koncentracija etanola je varirana u opsegu od 0,5-3,34 mol/dm<sup>3</sup> odnosno pri molskim odnosima kiseline i alkohola od 1:3-1:20. Na slici 4.12 su prikazani dobijeni stepeni konverzije pri različitim koncentracijama supstrata.

Sa slike 4.12 se vidi da sa smanjenjem molskog odnosa (n(alk):n(kis)) od 20 na 3 stepen konverzije etil-cinamata kontinualno raste i pri najmanjem molskom odnosu iznosi 88%. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da višak alkohola pogoduje sintezi estera do određene koncentracije, nakon čega dolazi do drastičnog pada stepena konverzije koji

nakon toga i dalje opada s porastom koncentracije alkohola, ali u manjoj meri i za najveći molski odnos ima najmanju vrednost od 30%. Određen višak etanola u reakcionoj smeši dovodi do boljeg rastvaranja supstrata, čime se usled veće koncentracije cimetine kiseline u mikrookolini enzima favorizuje sinteza estra. Naime, specifičnost enzima prema supstratu ne zavisi samo od interakcija enzim-supstrat, već i od hemijske reaktivnosti supstrata i njegove rastvorljivosti u datom sistemu. S druge strane višak etanola u reakcionoj smeši može da dovede do inhibicije enzima supstratom usled narušavanja vodenog mikrosloja neophodnog za aktivnost enzima. Ovakva inhibicija Novozyme 435 viškom etanola je već registrovana u literaturi [76, 130].



Slika 4.12. Zavisnost stepena konverzije etil-cinamata od molskog odnosa supstrata ( $n(kis):n(alk)$ ).

Uticao viška etanola ispitan je i preko  $\log P$  vrednosti početne reakcione smeše i rezultati su prikazani u tabeli 4.3. Vrednosti  $\log P$  za reakcione smeše pri različitim koncentracijama alkohola, izračunate su prema sledećoj formuli [178]:

$$(\log P)_{rs} = X_{ras} \cdot (\log P)_{ras} + X_{alk} \cdot (\log P)_{alk} + X_{kis} \cdot (\log P)_{kis} \quad (4.1)$$

gde su  $X_{ras}$ ,  $X_{alk}$  i  $X_{kis}$  molski udeli izooktana, etanola i cimetine kiseline, a  $(\log P)_{ras}$ ,  $(\log P)_{alk}$ ,  $(\log P)_{kis}$  njihove  $\log P$  vrednosti koje u ovom sistemu iznose  $\log P = 4,5$ ,  $\log P = -0,18$ , i  $\log P = 2,13$ , respektivno.

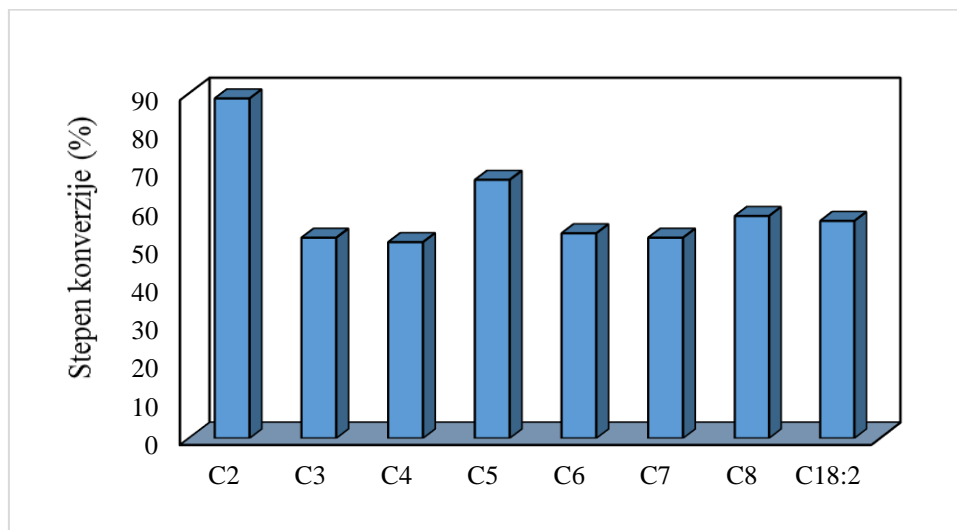
Tabela 4.3. Uticaj molskog odnosa supstrata na  $\log P$  vrednost smeše

Molski odnos	$(\log P)_{rs}$
3	4,08
5	3,81
7	3,61
9	3,41
10	3,32
12	3,15
15	2,94
17	2,75
20	2,54

Kao što se vidi iz tabele 4.3,  $\log P$  vrednost početne reakcione smeše se kreće u opsegu od  $\log P=2,54$  do  $\log P =4,08$ . Ovakav rezultat potpuno se slaže sa istraživanjem Laane-a i saradnika po kojem je za enzimsku sintezu optimalna vrednost  $\log P > 4$ , dok se u opsegu  $2 \leq \log P \leq 4$  očekuje umerena biokataliza [120]. Kao optimalna vrednost molskog odnosa uzeta je  $(n(\text{alk}):n(\text{kis}))=3$ , i sva dalja ispitivanja su izvedena pri ovom molskom odnosu. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima, jer se gotove sve sinteze fenolnih estara izvode u višku acil akceptora koji u nekim slučajevima ide i do  $(n(\text{alk}):n(\text{kis}))=100$  [97], ali je većina izvedena pri molskim odnosima do  $(n(\text{alk}):n(\text{kis}))=10$  [95, 113, 114].

Kao što se vidi iz dobijenih rezultata, variranjem molskog odnosa dolazi do promena u polarnosti reakcione smeše pa se na taj način menja selektivnost enzima prema supstratu. Imajući to u vidu, afinitet Novozyme 435 prema alifatičnim alkoholima ispitan je i pri molskom odnosu 1:3 i rezultati su prikazani na slici 4.13.

Sa slike 4.13 se vidi da zavisnost stepena konverzije od dužine ugljeničnog niza ima jedan maksimum, i to kada je kao nukleofil korišćen etanol. Sa porastom dužine ugljeničnog niza dolazi do naglog pada stepena konverzije, koji se nakon toga gotovo ne menja i kreće se u opsegu od 57-67%. Kada se ovi rezultati uporede sa rezultatima prikazanim na slici 4.5 uočava se da je smanjenje molskog odnosa supstrata imalo pozitivan efekat na sintezu svih estara, ali je on najviše izražen kod etanola, dok je kod ostalih alkohola ovaj efekat umereniji.



Slika 4.13. Uticaj dužine ugljeničnog lanca acil akceptora na stepen konverzije cimetine kiseline pri molskom odnosu 1:3.

Razlog najvećeg stepena konverzije ostvarenog sa etanolom, pored već pomenutih u poglavlju 4.2.1 može biti i rastvorljivost alkoholnih supstrata u izookatnu. Naime, Franson u svojoj doktorskoj disertaciji navodi da će polarni supstrati u nepolarnim sredinama favorizovati umereno nepolaran aktivni centar enzima u odnosu na ostajanje u nepolarnom rastvaraču [183]. Kako je etanol najpolarniji od ispitanih alkohola, prema ovoj hipotezi je očekivano i da stepen konverzije dobijen sa ovim supstratom bude najbolji.

Iako se prema strukturi aktivnog centra lipaze B može očekivati da ovaj enzim pokazuje veću selektivnost prema alkoholnim supstratima [184], u ovom radu to nije slučaj. Naime, aktivni centar lipaze B sastoji se iz dva kanala u koje se smeštaju kiselinski i alkoholni supstrat. Deo aktivnog centra u kom se vezuje kiselina je prostraniji, pa je očekivano da pokazuje široku specifičnost prema acil donorima, dok je s druge strane očekivana veća selektivnost prema acil akceptorima [156]. Međutim, u ovom eksperimentu korišćeni su samo alifatični nerazgranati alkoholi koji mogu da se "spakuju" u aktivni centar enzima koji je uzak i dugačak, pa su razlike u ostvarenim stepenima konverzije male, što je u skladu i sa drugim istraživanjima vezanim za sintezu estara fenolnih kiselina [112], ali i alifatičnih kiselina [185]. S druge strane Katsoura i saradnici su dobili veoma niske prinose u sintezi geraniol-ferulata sa Novozyme 435, dok je sa Lipozyme RM IM dobijen stepen konverzije sličan kao sa nerazgranatim alifatičnim

alkoholima, čime se potvrđuje da CALB pokazuje veću selektivnost prema alkoholnom supstratu koji je razgranat [88].

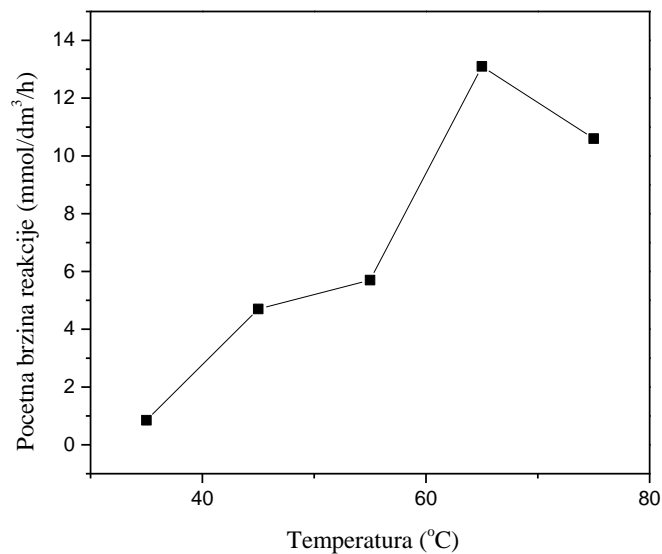
Sinteza estara cimetne kiseline je zato izvedena i sa voluminoznim aromatičnim alkoholima, benzil alkoholom i eugenolom, međutim estri ovih alkohola i cimetne kiseline nisu uspešno sintetisani. U reakcionoj smeši su primećeni tragovi benzil-cinamata, dok u slučaju eugenola proizvod nije detektovan ni u tragovima. Iz ovih rezultata je jasno da aromatični alkoholi nisu dobri supstrati za Novozyme 435.

Međutim, kako su u ovom eksperimentu kao acil donori korišćene voluminozne fenolne kiseline, moguće je da su sterne smetnje u aktivnom centru bile prevelike za sintezu estara sa aromatičnim alkoholima. Zbog toga je u nastavku pokušana sinteza estara eugenola i alifatičnih masnih kiselina. Ispitana je mogućnost sinteze deset estara i to sa masnim kiselinama od C2-C18 i aromatičnom benzoevom kiselinom. Kao reakcioni medijum korišćen je izooktan, na temperaturi od 55°C pri molskom odnosu 3 (n(kis):n(alk)). Nakon 7 dana reakcije prinos nije detektovan ni u jednoj od reakcionih smeša. Ovakav rezultat potvrđuje da Novozyme 435 pokazuje veću selektivnost prema alkoholnim supstratima, jer su masne kiseline koje su korišćene kao acil donori uobičajeni supstrati za ovaj enzim.

#### 4.2.6 Uticaj temperature na sintezu estara cimetne kiseline

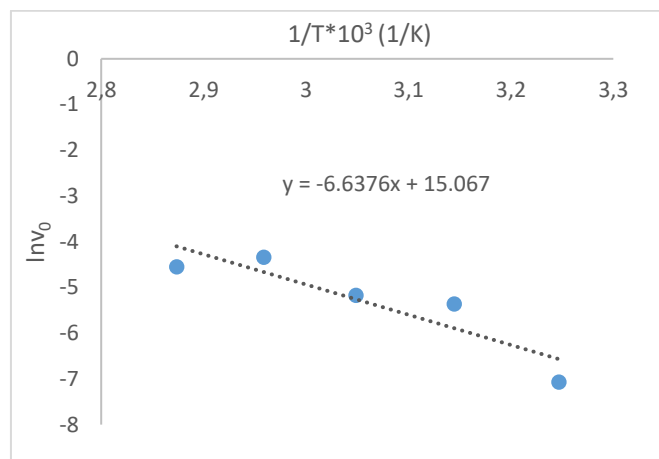
Uticaj temperature na sintezu etil-cinamata ispitan je u opsegu temperatura od 35-75°C. Reakcije su izvedene u izooktanu, pri molskom odnosu od 1:3 i koncentraciji enzima od 15 mg/cm<sup>3</sup>. Na slici 4.14 je prikazana dobijena zavisnost početnih brzina od temperature.

Kao što se vidi na slici 4.14, vrednost početne brzine reakcije raste sa povećanjem temperature, od 0,85 mmol/dm<sup>3</sup>/h na 35°C do maksimuma od 13,1 mmol/dm<sup>3</sup>/h na 65°C, nakon čega dolazi do pada i na 75°C brzina iznosi 10 mmol/dm<sup>3</sup>/h. Iz prikazanih rezultata se jasno vidi da je optimalna temperatura sinteze etil-cinamata 65°C. Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima, gde se optimalna temperatura sinteze estara sa Novozyme 435 kreće u opsegu od 55-70°C [77, 85, 90], međutim u literaturi se mogu naći i znatno niže temperature kada se u reakcijama sinteze fenolnih estara kao biokatalizator ne koristi CALB [103].



Slika 4.14. Uticaj temperature na početnu brzinu reakcije.

Porast početne brzine sa temperaturom prati Arenijusovu zavisnost (Slika 4.15). Iz nagiba ove zavisnosti je izračunata energija aktivacije reakcije, a koja iznosi 55,2 kJ/mol. Energija aktivacije sinteze etil-cinamata slaže se sa literaturnim podacima vezanim za energije aktivacije sinteze fenolnih estara [32, 169], i uopšte reakcije katalizovane sa Novozyme 435, dok je nešto viša od drugih reakcija katalizovanih lipazama a koje se kereću u opsegu od 0,97–34,5 kJ/mol.



Slika 4.15. Arenijusov dijagram zavisnosti početne brzine reakcije od temperature.

#### 4.2.7 Optimizacija sinteze oleil-cinamata

Reakcija sinteze oleil-cinamata izabrana je kao model reakcija za sintezu fenolnih lipida. S ciljem postizanja što većeg prinosa estera, kao i produktivnosti procesa, izvršena

je optimizacija procesnih parametara i to: reakcionog medijuma, koncentracije supstrata i enzima, temperature i reakcionog vremena.

Postoje dva pristupa za optimizaciju procesnih parametara. Prvi je konvencionalna metoda koja je korišćena prilikom optimizacije sinteze etil- i butil-cinamata, kada se varira jedan faktor a svi ostali faktori se drže na konstantnim vrednostima. Ovakav pristup ne pruža informacije o međusobnim interakcijama između parametara, ne garantuje nalaženje optimalnih uslova i najčešće je dugotrajan. S druge strane, korišćenjem statističkih metoda planiranja, moguće je dobiti informaciju o postojanju i prirodi interakcija između parametara. Ovaj pristup pojednostavljuje ispitivanje i razumevanje kompleksnih procesa, a takođe se broj eksperimenata neophodnih za nalaženje optimalnih uslova reakcije svodi na minimum, čime se direktno smanjuju troškovi istraživanja. Imajući u vidu navedene prednosti korišćenja statističkih alata optimizacija sinteze oleil-cinamata izvršena je primenom centralnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina.

Preliminarna ispitivanja uključila su pronalaženje adekvatnog reakcionog medijuma za sintezu oleil-cinamata. Iako se izooktan pokazao kao najbolji reakcioni medijum u sintezi etil- i butil-cinamata postoji velika razlika u rastvorljivosti, polarnosti i viskoznosti primenjenih acil akceptora čime se utiče na promenu koeficijenta raspodele supstrata i proizvoda između površine nosača i reakcionog medijuma, kao i na prenos mase usled različite difuzivnosti acil akceptora. Prilikom odabira rastvarača pogodnog za sintezu oleil-cinamata, korišćeni su reakcioni uslovi koji su se pokazali kao optimalni u sintezi etil-cinamata. Rezultati dobijeni prilikom ispitivanja uticaja organskog rastvarača na stepen konverzije oleil-cinamata prikazani su u tabeli 4.4.

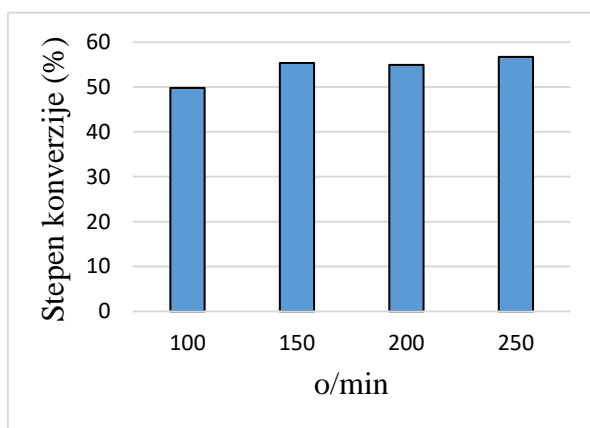
*Tabela 4.4. Stepem konverzije u različitim rastvaračima nakon 48 h.*

Rastvarač	<i>n</i> -Heksan	Izooktan	<i>terc</i> -butanol	Aceton
log <i>P</i>	3,5	4,5	0,35	-0,208
Stepen konverzije, %	55,6	56,7	20	Tragovi

Iz dobijenih rezultata se jasno vidi da su najbolji prinosi postignuti kada su kao reakcioni medijum korišćeni nepolarni organski rastvarači. Slično kao kod sinteze etil- i butil-cinamata najveći stepeni konverzije su postignuti u izooktanu, međutim visoke vrednosti su dobijene i prilikom sinteze oleil-cinamata u *n*-heksanu. Slični rezultati su

dobijeni u sintezi velikog broja estara fenolnih kiselina [90, 122, 158]. Pored već pomenutog uticaja nepolarnih rastvarača na stabilnost i fleksibilnost CALB, u obzir treba uzeti i slabu rastvorljivost dobijenog estera u polarnim rastvaračima pa je moguće da se proizvod sporije uklanja sa površine enzima, što otežava pristup supstrata enzimu i usporava reakciju [3]. Za dalju optimizaciju sinteze oleil-cinamata izabran je izooktan u kom je ostvaren nešto viši stepen konverzije, a takođe poseduje temperaturu ključanja koja je za 30,5°C viša u odnosu na temperaturu ključanja *n*-heksana, čime se omogućava rad u širem opsegu temperatura, što je značajno prilikom rada sa CALB koja je termostabilan enzim.

Sa slike 4.16, na kojoj je prikazan uticaj intenziteta mešanja na stepen konverzije oleil-cinamata, se vidi da ne dolazi do pada stepena konverzije sa porastom intenziteta mešanja kao u slučaju etil-cinamata. Razlog ovakve pojave je relativno visoka viskoznost oleil alkohola pa je za postizanje efikasnog mešanja reakcione smeše neophodna veća snaga, odnosno brzina mešanja. Naime, viskozitet oleil alkohola na sobnoj temperaturi iznosi 28,3 mPa s, što je gotovo 27 puta više od viskoziteta etanola na istoj temperaturi [159]. Iz jed. (4.19 se vidi da je difuzivnost supstrata obrnuto proporcionalna viskozitetu reakcione smeše, kao i da uneta snaga po jedinici zapremine raste s porastom viskoziteta, tako da su za efikasno mešanje reakcione smeše s oleil alkoholom neophodne veće brzine mešanja u poređenju sa etanolom.



Slika 4.16. Uticaj intenziteta mešanja na stepen konverzije oleil-cinamata.

Dalja optimizacija sinteze oleil-cinamata izvršena je primenom centralnog rotatabilnog eksperimentalnog plana koji je podrazumevao izvođenje 32 eksperimenta pri



čemu je pet reakcionih parametra varirano na pet nivoa vrednosti. Plan primenjen u ovom istraživanju uključuje: 16 faktorskih, 10 aksijalnih i 6 centralnih tačaka. Ispitivan je uticaj pet faktora u sledećim opsezima vrednosti: temperatura (43-71°C), početni molski odnos (n(alk):n(kis))(1-9), masa enzima (20-100 mg), početna koncentracija cimetne kiseline (0,11-0,29 mol/dm<sup>3</sup>) i vreme reakcije (12-108 h). Stvarne i kodirane vrednosti faktora prikazane su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5 Kodirane i stvarne vrednosti parametra u primenjenom eksperimentalnom planu

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Temperatura, X <sub>1</sub> (°C)	43	50	57	64	71
Molski odnos supstrata, X <sub>2</sub>	1	3	5	7	9
Masa enzima, X <sub>3</sub> (mg)	20	40	60	80	100
Početna koncentracija cimetne kiseline, X <sub>4</sub> (mol/dm <sup>3</sup> )	0,05	0,11	0,17	0,23	0,29
Vreme reakcije, X <sub>5</sub> (h)	12	36	60	84	108

Eksperimenti su izvedeni nasumičnim rasporedom da bi se eliminisale eventualne sistematske greške eksperimenta. Pored stepena konverzije (Y<sub>1</sub>, %) ispitan je uticaj eksperimentalnih faktora na dve dodatne odzivne veličine: produktivnost procesa izraženu kao koncentraciju proizvoda (Y<sub>2</sub>, mmol/dm<sup>3</sup>) i specifičnu aktivnost enzima (Y<sub>3</sub>, IU/g). Razlog je ekonomski aspekt procesa, naime kada se kao izlazna veličina posmatra samo stepen konverzije u cilju dobijanja što boljeg rezultata, radi se sa malim početnim koncentracijama supstrata i velikom koncentracijama enzima, pa se samim tim dobijaju niski prinosi proizvoda, a sami procesi nisu ekonomični. Pored cene enzima, potrošnja energija predstavlja značajan faktor u rentabilnosti procesa, pa je smanjenje vremena reakcije jedan od načina da se smanje ukupni troškovi. Zbog toga je pored prinosa proizvoda praćena i specifična aktivnost enzima koja u obzir uzima i vreme trajanja reakcije i masu enzima.

Primenjeni eksperimentalni plan i rezultati izvedenih eksperimenata su prikazani u tabeli 4.6. Dobijeni rezultati su modelovani jednačinom drugog reda koja uključuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora:

$$y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^5 \beta_{ki} \cdot X_i + \sum_{i=1}^5 \beta_{kii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{kij} \cdot X_i \cdot X_j \quad (4.2)$$

gde je Y odzivna veličina (stepen konverzije, prinos estra i produktivnost procesa),  $\beta_{k0}$ ,  $\beta_{ki}$ ,  $\beta_{kii}$  i  $\beta_{kij}$  koeficijent za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijenti regresije, a  $X_i$  i  $X_j$  nezavisne varijable. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička signifikantnost određeni su korišćenjem statističkog softvera Design Expert Statistical Software 8.0.7.1 (Stat Ease Inc., Mineapolis, SAD).

*Tabela 4.6. Eksperimentalni plan za ispitivanje uticaja pet faktora na pet nivoa vrednosti metodom odzivnih površina i dobijeni rezultati*

Broj eksp.	$X_1$ , °C	$X_2$	$X_3$ , mg	$X_4$ , mol/dm <sup>3</sup>	$X_5$ , h	$Y_1$ , %	$Y_2$ , mmol/dm <sup>3</sup>	$Y_3$ , (IU/g)
1	50 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	0,11 (-1)	84 (1)	87,6	96,3	2,39
2	64 (1)	3 (-1)	40 (-1)	0,11 (-1)	36 (-1)	95,0	104,5	6,04
3	50 (-1)	7 (1)	40 (-1)	0,11 (-1)	36 (-1)	30,8	33,9	1,96
4	64 (1)	7 (1)	40 (-1)	0,11 (-1)	84 (1)	95,0	104,5	2,60
5	50 (-1)	3 (-1)	80 (1)	0,11 (-1)	36 (-1)	68,2	75,0	2,17
6	64 (1)	3 (-1)	80 (1)	0,11 (-1)	84 (1)	92,7	101,2	1,26
7	50 (-1)	7 (1)	80 (1)	0,11 (-1)	84 (1)	83,7	92,1	1,14
8	64 (1)	7 (1)	80 (1)	0,11 (-1)	36 (-1)	93,2	102,5	2,97
9	50 (-1)	3 (-1)	40 (-1)	0,11 (-1)	36 (-1)	17,7	40,7	2,36
10	64 (1)	3 (-1)	40 (-1)	0,23 (1)	84 (1)	89,4	205,7	5,10
11	50 (-1)	7 (1)	40 (-1)	0,23 (1)	84 (1)	32,6	75,0	1,86
12	64 (1)	7 (1)	40 (-1)	0,23 (1)	36 (-1)	34,3	78,8	4,56
13	50 (-1)	3 (-1)	80 (1)	0,23 (1)	84 (1)	81,3	187,0	2,32
14	64 (1)	3 (-1)	80 (1)	0,23 (1)	36 (-1)	86,0	197,8	5,72
15	50 (-1)	7 (1)	80 (1)	0,23 (1)	36 (-1)	23,0	52,9	1,53
16	64 (1)	7 (1)	80 (1)	0,23 (1)	84 (1)	88,5	203,5	2,52
17	43 (-2)	5 (0)	60 (0)	0,17 (0)	60 (0)	21,0	35,7	0,83

18	71	(2)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	94,9	161,4	3,74
19	57	(0)	1	(-2)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	97,5	165,7	3,83
20	57	(0)	9	(2)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	55,0	93,5	2,16
21	57	(0)	5	(0)	20	(-2)	0,17	(0)	60	(0)	28,9	49,1	3,416
22	57	(0)	5	(0)	100	(2)	0,17	(0)	60	(0)	92,2	156,8	2,18
23	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,05	(-2)	60	(0)	94,8	47,4	1,10
24	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,29	(2)	60	(0)	47,9	138,8	3,21
25	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	12	(-2)	25,4	43,2	5,00
26	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	108	(2)	92,4	157,4	2,02
27*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	77,9	132,4	3,07
28*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	79,8	135,6	3,14
29*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	78,4	133,3	3,09
30*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	69,0	117,3	2,72
31*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	87	147,9	3,42
32*	57	(0)	5	(0)	60	(0)	0,17	(0)	60	(0)	79	134,3	3,11

\*centralna tačka

Iz tabele 4.6. se odmah vidi da reakcioni parametri pokazuju različite efekte na ispitivane varijable. Najveća vrednost stepena konverzije od 97,5%, ostvarena je u eksperimentu br. 19, koji je izveden na 57°C, pri molском odnosu od 1:1, masi enzima od 60 mg, koncentraciji cimetine kiseline od 0,17 mol/dm<sup>3</sup> za 60 h. Međutim, visoke vrednosti stepena konverzije postignute su i u eksperimentima: 2, 4, 6, 18, 22, 23 i 26, koji su svi izvedeni pri nižim početnim koncentracijama cimetine kiseline, što ukazuje na to da se veće konverzije postižu sa niskim početnim koncentracijama limitirajućeg supstrata. S druge strane maksimalan prinos proizvoda ostvaren je u eksperimentu br. 10 u kom je korišćena veća koncentracija kiseline 0,23 mol/dm<sup>3</sup>, na 64°C, molском odnosu od 3:1, sa 40 mg enzima za 84 h. Najveća specifična aktivnost dobijena je u eksperimentu

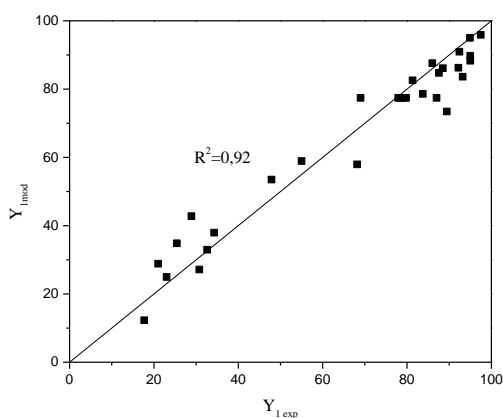
br.2, koji je izveden sa koncentracijom kiseline od 0,11 mol/dm<sup>3</sup>, pri molskom odnosu od 1:3, sa 40 mg enzima na 64°C za 36 h.

Prema primenjenoj statističkoj metodi, rezultati se analiziraju pomoću višestruke regresione analize kako bi se utvrdila stvarna veza između odzivnih veličina i eksperimentalnih faktora. Analiza varijanse (ANOVA) izvedena pomoću Design expert softverskog paketa pokazala je da su regresioni modeli signifikantni ( $p < 0,01$ ), odnosno da adekvatno opisuju zavisnost između eksperimentalnih faktora i odziva, tj. stepena konverzije, prinosa proizvoda i specifične aktivnosti, što se vidi iz dobijenih vrednosti koeficijenata determinacije ( $R^2$ ) (slika 4.17). Signifikantnost regresionih koeficijenata ( $p < 0,01$ ) određena je pomoću ANOVA testa i nakon eliminacije nesignifikantnih parametara dobijene su sledeće regresione jednačine.

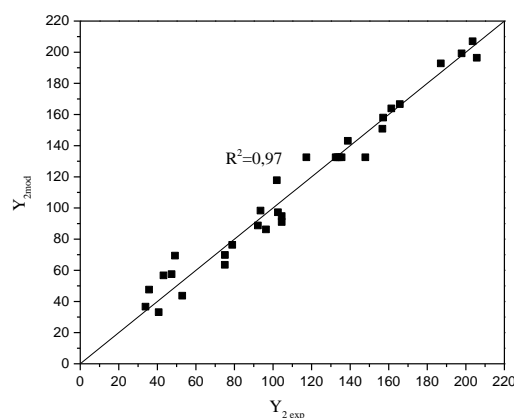
$$y_1 (\%) = 77,42 + 16,54x_1 - 9,24x_2 + 10,87x_3 - 11,96x_4 + 14,03x_5 - 5,53x_1 x_5 + 4,70x_3 x_4 - 3,87x_1^2 - 3,22x_3^2 - 3,63x_5^2 \quad (4.3)$$

$$y_2 (mmol/dm^3) = 132,52 + 29,07x_1 - 17,09x_2 + 20,35x_3 + 21,40x_4 + 25,33x_5 + 13,37x_1 x_4 - 7,26x_1 x_5 - 11,00x_2 x_4 + 13,03x_3 x_4 + 13,87x_4 x_5 - 6,69x_1^2 - 5,59x_3^2 - 8,05x_4^2 - 6,08x_5^2 \quad (4.4)$$

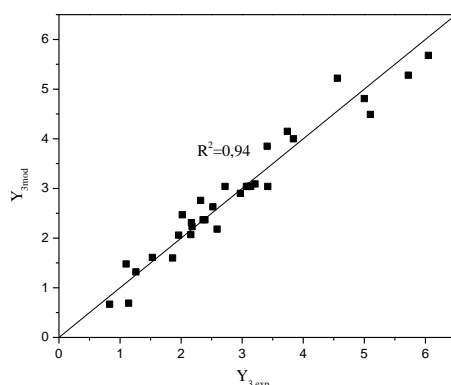
$$y_3 (IU/g) = 3,04 + 0,87x_1 - 0,48x_2 - 0,40x_3 + 0,40x_4 - 0,59x_5 - 0,28x_1 x_3 + 0,29x_1 x_4 - 0,47x_1 x_5 + 0,23x_3 x_4 + 0,21x_4 x_5 - 0,16x_1^2 - 0,19x_4^2 + 0,15x_5^2 \quad (4.5)$$



a)



b)



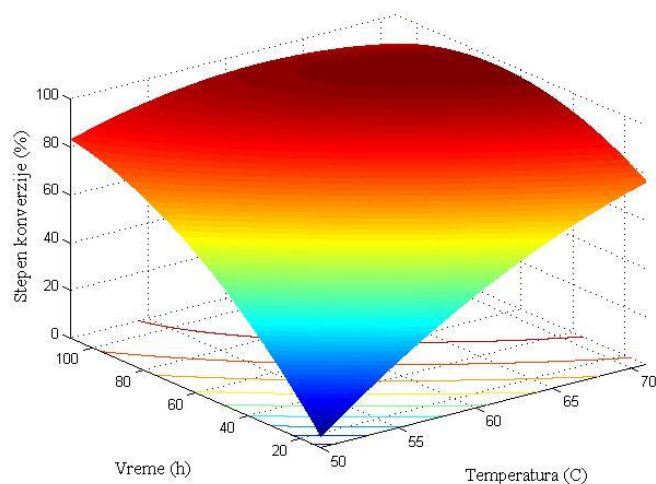
c)

Slika 4.17. Grafički prikaz odstupanja regresionih modela od eksperimentalnih vrednosti a) model za stepen konverzije; b) model za prinos proizvoda; c) model za specifičnu aktivnost.

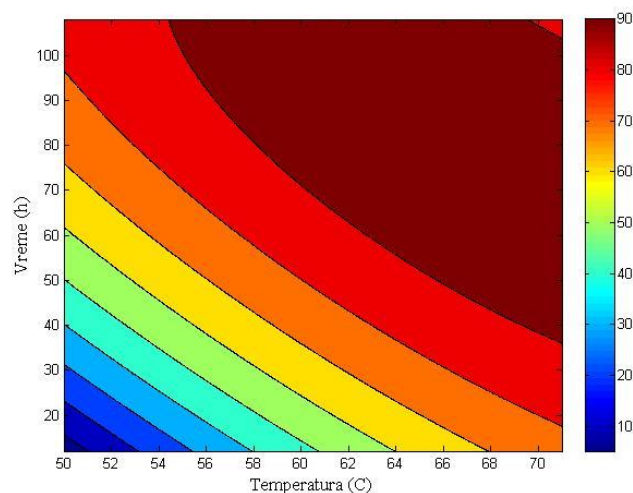
#### 4.2.7.1 Uticaj temperature

Na osnovu dobijenog regresionog modela (jed. 4.3) dolazi se do zaključka da je temperatura faktor koji ima najveći uticaj na stepen konverzije oleil-cinamata, budući da je vrednost koeficijenta uz linearni član ovog faktora najveća. Kako su pored linearnog signifikantni i koeficijenti uz kvadratni član i interakciju sa vremenom, uticaj temperature na stepen konverzije se može prikazati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Slično je i kod modela za prinos proizvoda i specifičnu aktivnost.

Na slici 4.18 se lako uočava oblast u kojoj je ostvaren maksimalni stepen konverzije oleil-cinamata ~100 %, pri vrednostima temperature i reakcionog vremena od 69°C i 80 h. Kako brzina enzimske reakcije raste sa porastom temperature, u početnim fazama sinteze oleil-cinamata dolazi do konstantnog rasta stepena konverzije. Međutim, sa produženjem reakcionog vremena temperaturni optimum se pomera ka nižim vrednostima.



a)



b)

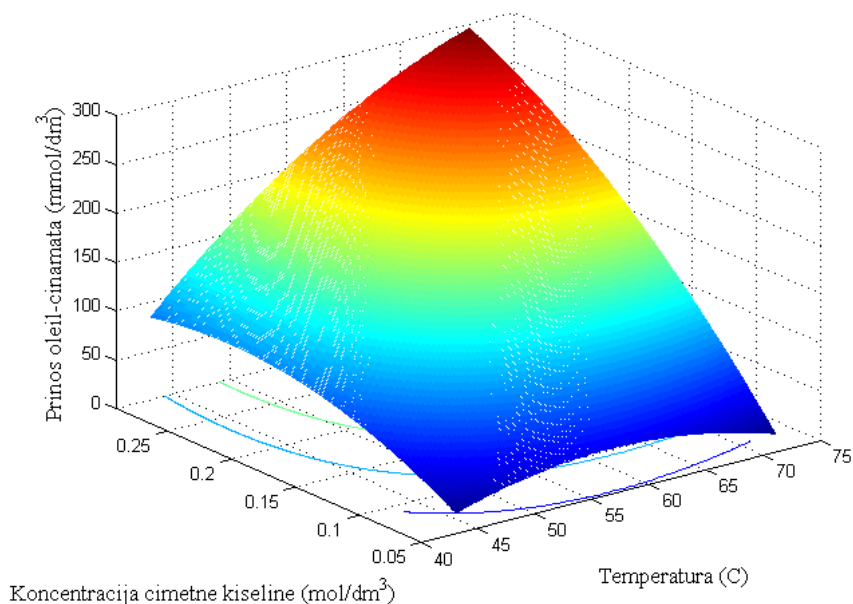
Slika 4.18. a) Uticaj temperature i reakcionog vremena na stepen konverzije oleil-cinamata ( $x_2=3$ ;  $x_3=48$  mg;  $x_4=0,17$  mol/dm<sup>3</sup>); b) Projekcija ove površine.

Do pada stepena konverzije pri dugotrajnom izlaganju visokim temperaturama dolazi zbog inaktivacije enzima usled termičke denaturacije. Sličan fenomen uočen je u sintezi izoamil-butirata, međutim kako je ova reakcija katalizovana lipazom iz *C. rugosa* koja ima značajno niži temperaturni optimum od CALB, negativna interakcija reakcionog vremena i temperature je znatno izraženija [3]. Razlog nešto više optimalne temperature u sintezi oleil-cinamata u poređenju sa etil- i butil-cinamatom može biti posledica velike razlike u viskoznosti primenjenih acil akceptora, pa efekat smanjene viskoznosti reakcione smeše tj. olakšane difuzije supstrata s porastom temperature ima veći uticaj na stepen konverzije oleil-cinamata u poređenju sa etil- i butil-cinamatom.

Dobijena optimalna temperatura sinteze oleil-cinamata viša je od temperature koju je za istu reakciju prijavio Lue sa svojom grupom, a koja je iznosila 55°C [169]. U literaturi postoji nekoliko studija u kojima su kao optimalne prijavljene temperature više od 70°C, a najčešći razlog ovako visokih temperatura je smanjena viskoznost reakcione smeše, čime je omogućena olakšana difuzija supstrata [89].

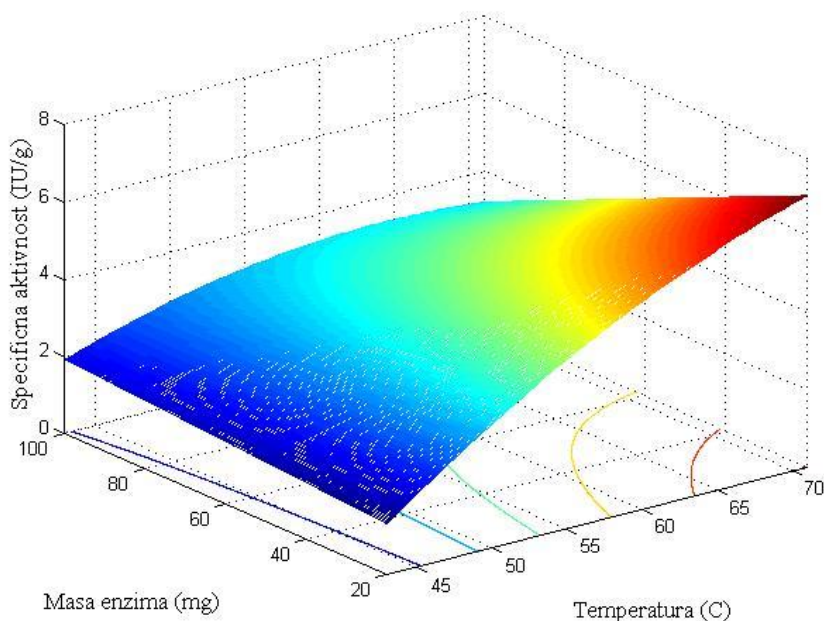
Slična negativna interakcija vremena i temperature uočena je i kod regresionih modela za prinos proizvoda i specifičnu aktivnost enzima (jed. 4.4 i 4.5), što je potpuno očekivano kada se ima u vidu da se na višim temperaturama za kraće vreme postižu veći stepeni konverzije, pa samim tim i prinosi proizvoda. Uticaj temperature na prinos proizvoda i specifičnu aktivnost definisan je i sa pozitivnom interakcijom sa koncentracijom cimetne kiseline, dok je kod modela za specifičnu aktivnost značajan i koeficijent koji opisuje interakciju sa masom enzima.

Na slici 4.19 koja prikazuje uticaj temperature i koncentracije cimetne kiseline na prinos oleil-cinamata se jasno vidi da se najveći prinosi postižu na visokim temperaturama pri velikim koncentracijama proizvoda. Slično je i kod modela za specifičan prinos. Razlog je pozitivan uticaj temperature na brzinu reakcije, odnosno stepen konverzije, kao i olakšana difuzija supstrata usled smanjenja viskoziteta reakcione smeše i veće rastvorljivosti cimetne kiseline na višim temperaturama.



Slika 4.19. Uticaj temperature i koncentracije cimetne kiseline na prinos oleil-cinamata ( $x_2=1$ ;  $x_3=50$  mg;  $x_4=70$  h).

Zavisnost specifične enzimске aktivnosti od temperature i mase enzima prikazana je na slici 4.20. Kako je koeficijent koji opisuje ovu interakciju negativan, na slici 4.20 se vidi da se najveće aktivnosti postižu na visokim temperaturama i pri malim masama enzima. Kao zaključak može da se izvede da je temperatura od 69°C optimalna u sintezi oleil-cinamata, nezavisno od ispitivanog odziva.



Slika 4.20. Uticaj temperature i mase enzima na specifičnu aktivnost esterifikacije oleil-cinamata ( $x_2=1$ ;  $x_4=0,23 \text{ mol/dm}^3$ ;  $x_5=70 \text{ h}$ ).

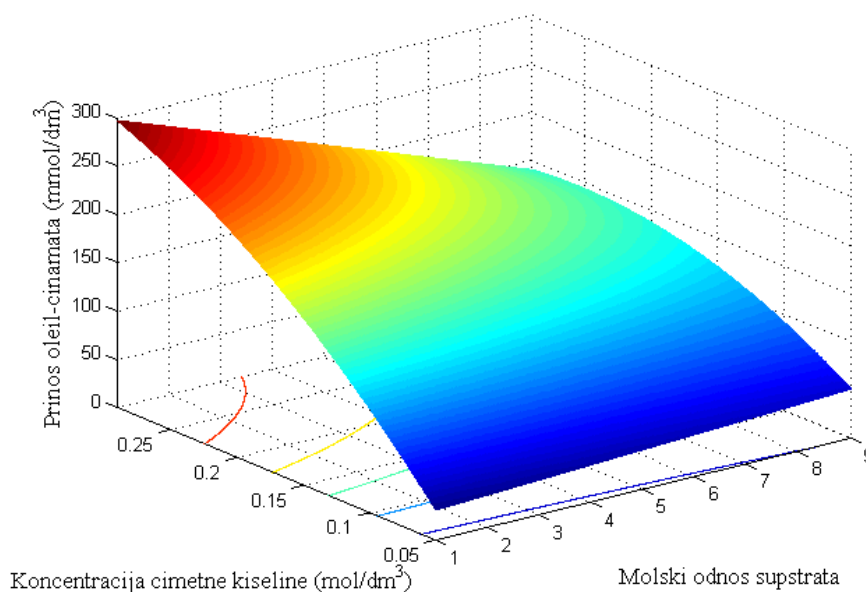
#### 4.2.7.2 Uticaj koncentracije supstrata

Uticaj koncentracije supstrata ispitan je kroz dva eksperimentalna faktora: koncentraciju cimetne kiseline i molski odnos supstrata. Dobijeni regresioni modeli za sva tri odziva su pokazali da su oba ispitivana faktora signifikantna, međutim optimalna koncentracija cimetne kiseline se znatno razlikuju zavisno od modela, dok molski odnos ima sličan uticaj na svaki od odziva. Naime, molski odnos supstrata ima negativan linearni koeficijent regresije u sva tri modela, što se manifestuje linearnim padom odzivnih veličina sa porastom molskog odnosa, kao što se vidi na slici 4.21. Razlog negativnog uticaja oleil alkohola je njegova relativno velika viskoznost zbog čega pri velikim koncentracijama ovog supstrata dolazi do većih otpora prenosu mase, tj. otežanog pristupa cimetne kiseline aktivnom centru enzima. Koeficijent prenosa mase buterne kiseline u smeši oleil alkohola i dodekana smanjio se za 25 % sa porastom udela oleil



alkohola od 0-80% [186]. Takođe, ovakav rezultat ukazuje na moguću inhibiciju enzima alkoholom u višku, što nije redak slučaj u enzimski katalizovanim reakcijama [3, 76].

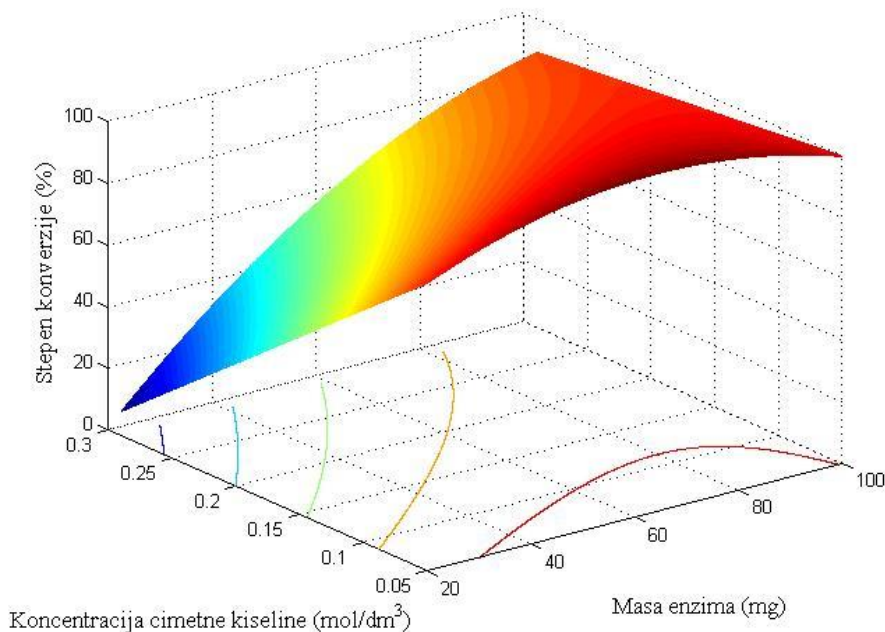
Interesantna je negativna interakcija molskog odnosa supstrata i koncentracije limitirajućeg supstrata kod modela za prinos proizvoda (jed. 4.4). Kao što se vidi sa slike (slika 4.21) najveći prinosi proizvoda ostvareni su pri niskim vrednostima molskog odnosa i visokim vrednostima limitirajućeg supstrata. Ovakav rezultat je posledica velike viskoznosti reakcione smeše pri velikim početnim koncentracijama kiseline i velikoj vrednosti molskog odnosa, jer je tada udeo oleil alkohola u reakcionoj smeši veliki. Generalno, za svaki od odziva se pokazalo da je molski odnos od 1:1 optimalan.



Slika 4.21. Uticaj molskog odnosa supstrata i koncentracije cimetne kiseline na prinos oleil cinamata ( $x_1=69$  °C;  $x_3=60$  mg;  $x_5=60$  h).

U jed. 4.3 uticaj koncentracije cimetne kiseline opisan je kroz negativan koeficijent uz linearni član, pa su stoga najviši stepeni konverzije ostvareni u eksperimentima sa niskom početnom koncentracijom ovog supstrata, dok sa porastom koncentracije kiseline dolazi do linearnog pada stepena konverzije. Pored linearnog, signifikantan je i pozitivan koeficijent interakcije sa masom enzima koja je prikazana na slici 4.22. Zbog pozitivne interakcije koncentracije cimetne kiseline i mase enzima pri većim masama enzima dolazi do značajnog ublažavanja negativnog efekta koncentracije cimetne kiseline na stepen konverzije. Pozitivna interakcija koncentracije cimetne kiseline i mase enzima je potpuno očekivana, naime za konverziju većeg broja molekula supstrata neophodno je više acil

enzim kompleksa, dakle veća koncentracija enzima. Optimalna koncentracija cimetine kiseline je  $0,11 \text{ mol/dm}^3$ .



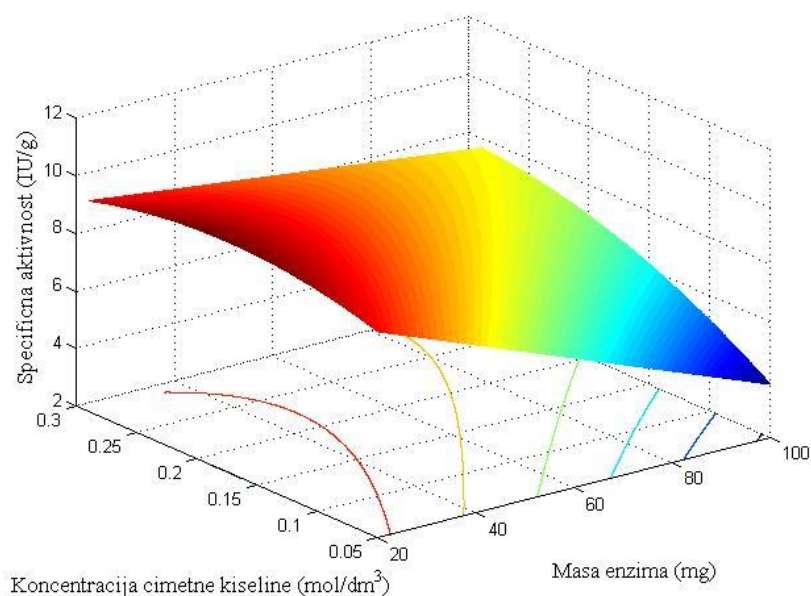
Slika 4.22. Uticaj mase enzima i koncentracije cimetine kiseline na stepen konverzije oleil-cinamata ( $x_1=64 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $x_2=6$ ;  $x_3=60 \text{ h}$ ).

S druge strane koncentracija cimetine kiseline ima nešto složeniji uticaj na prinos proizvoda i specifičnu aktivnost. Osnovna razlika je pozitivna vrednost koeficijenta uz linearni član, pa sa porastom koncentracije cimetine kiseline raste svaki od odziva kao što se vidi na slikama 4.21 i 4.23. Takođe, u oba modela signifikantni su i koeficijenti uz kvadratni član i to sa negativnom vrednošću, i interakcija sa reakcionim vremenom, pa se uticaj koncentracije kiseline na prinos i specifičnu aktivnost enzima može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Sa slike 4.21 se vidi da oblast u kojoj se dostiže maksimalni prinos oleil-cinamata zavisi od molskog odnosa usled postojanja negativne interakcije između koncentracije kiseline i molskog odnosa. Za najmanju vrednost molskog odnosa prinos oleil-cinamata raste u celom opsegu ispitivanih koncentracija, dok se sa porastom molskog odnosa koncentracija pri kojoj se postiže maksimum pomera ka nižim vrednostima. Slično je i kod modela za specifičan prinos, pa je optimalna koncentracija cimetine kiseline za postizanje maksimalnog prinosa proizvoda  $0,29 \text{ mol/dm}^3$ , dok je za postizanje maksimalne specifične aktivnosti esterifikacije optimum koncentracije cimetine kiseline nešto niži i iznosi  $0,175 \text{ mol/dm}^3$ .

### 4.2.7.3 Uticaj mase enzima

Kao što je već pomenuto, optimizacija koncentracije enzima je od izuzetnog značaja u enzimskim procesima, jer je cena enzima najveća stavka u ukupnim troškovima procesa. Masa enzima ima gotovo isti uticaj na stepen konverzije i prinos proizvoda, gde je pored pozitivnog linearnog člana značajna i pozitivna interakcija sa koncentracijom cimetne kiseline, kao i kvadratni član. Na slici 4.22 se vidi da s porastom mase enzima pri velikim koncentracijama kiseline stepen konverzije raste u celom ispitivanom opsegu, dok se kod malih koncentracija kiseline maksimum pomera ka nižim vrednostima. Blagi pad stepena konverzije sa porastom mase enzima pri niskim koncentracijama supstrata može biti posledica aglomeracije enzima usled čega dolazi do smanjenja kontaktne površine enzima i supstrata odnosno otežanog prenosa mase. Optimalna masa enzima za postizanje maksimalnih stepena konverzije je 70 mg, odnosno 1,4% (w/v), dok je kod prinosa oleil-cinamata optimalna vrednost nešto veća, i iznosi 90 mg, odnosno 1,8% (w/v).

S druge strane kod modela za specifičnu aktivnost masa enzima ima negativan koeficijent uz linearni član, pa sa porastom ovog faktora specifična aktivnost linearno opada u čitavom ispitivanom opsegu mase biokatalizatora (slika 4.23). Ovaj efekat je ublažen pri većim koncentracijama cimetne kiseline. Optimalna vrednost mase enzima u ovom modelu iznosi 20 mg, odnosno 0,4 % (w/v).

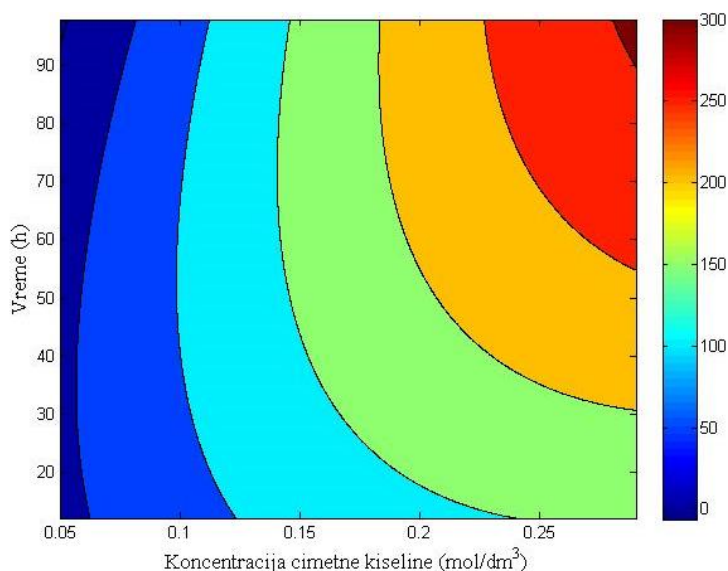


Slika 4.23. Uticaj mase enzima i koncentracije cimetne kiseline na specifičnu aktivnost esterifikacije oleil-cinamata ( $x_1=69$  °C;  $x_2=1$ ;  $x_5=14$  h).

#### 4.2.7.4 Uticaj reakcionog vremena

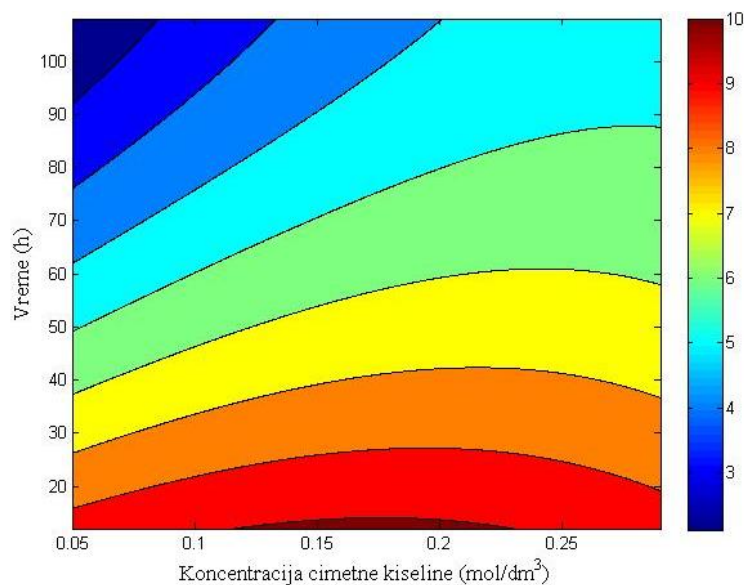
Uticaj vremena je još jedan od faktora čiji se optimumi razlikuju od modela do modela. Kod regresionog modela koji opisuje zavisnost stepena konverzije od eksperimentalnih faktora, kao što se vidi na slici 4.18 optimalno vreme je 80 h. Usled negativne reakcije sa temperaturom, optimum se pomera ka višim vrednostima sa sniženjem temperature.

Kod modela za prinos proizvoda signifikantan je i pozitivan koeficijent interakcije sa koncentracijom cimetne kiseline. Na slici 4.24 se vidi da se maksimalni prinosi ostvaruju kada oba parametra imaju visoke vrednosti, odnosno pri reakcionom vremenu od 96 h i kao što je već pomenuto koncentraciji kiseline od 0,29 mol/dm<sup>3</sup>.



Slika 4.24. Projekcija uticaja koncentracije cimetne kiseline i vremena na prinos oleil-cinamata ( $x_1=69$  °C;  $x_2=1$ ;  $x_3=45$  mg).

Na slici 4.25 se vidi uticaj vremena na specifičnu aktivnost esterifikacije oleil-cinamata. Porast reakcionog vremena dovodi do pada specifične aktivnosti zahvaljujući negativnom koeficijentu uz linearni član. Moguće je da do pada specifične aktivnosti sa vremenom dolazi usled denaturacije enzima toplotom i posledične agregacije enzima, što je više izraženo pri dužem trajanju reakcije. Ovaj efekat je manje izražen pri većim koncentracijama supstrata zbog pozitivne interakcije između ova dva faktora. Optimalno reakciono vreme za postizanje maksimalne specifične aktivnosti je 14 h.



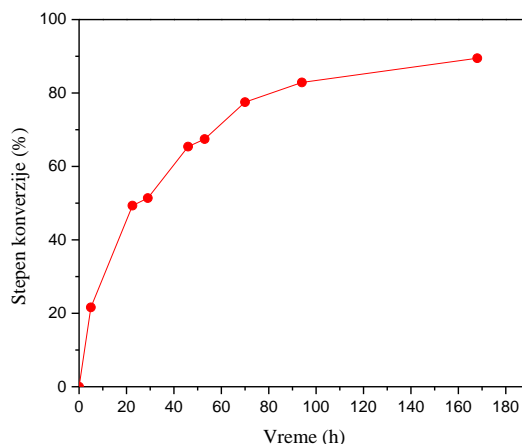
Slika 4.25. Projekcija uticaja koncentracije cimetine kiseline i vremena na specifičnu aktivnost esterifikacije oleil-cinamata ( $x_1=69$  °C;  $x_2=1$ ;  $x_3=20$  mg).

#### 4.2.7.5 Sinteza oleil-cinamata transesterifikacijom etil-cinamata

Pored esterifikacije cimetine kiseline oleil alkoholom, ispitana je i mogućnost alkoholize etil-cinamata sa oleil alkoholom pomoću Novozyme 435. Reakcija je izvedena pri dva molska odnosa, 3 i 15 (n(acil akc):n(acil don)) u izooktanu i dobijene su početne brzine od  $0,4 \text{ mmol/dm}^3/\text{h}$  odnosno  $7,2 \text{ mmol/dm}^3/\text{h}$ . Kao što se vidi iz dobijenih vrednosti, kada se oleil-cinamat sintetiše reakcijom transesterifikacije etil-cinamata, višak oleil alkohola pogoduje sintezi, za razliku od reakcije esterifikacije cimetine kiseline. Razlog može da bude bolja rastvorljivost etil-cinamata u nepolarnim sredinama, naime  $\log P$  vrednost ovog estera je 2,99, dok je  $\log P$  vrednost cimetine kiseline 2,13. U slučaju cimetine kiseline koja se loše rastvara u izooktanu, višak viskoznog oleil alkohola može da dovede do neravnomerne raspodele supstrata u reakcionoj smeši. Međutim, u slučaju etil-cinamata koji se bolje rastvara u izooktanu višak oleil alkohola ne dovodi do iste nehomogene raspodele supstrata, pa preovlađuje pozitivan uticaj viška supstrata usled dejstva Zakona o dejstvu masa.

Sa slike 4.26 se vidi da nakon 23 h reakcije dolazi do pada brzine reakcije koja je nakon ovog vremena sporija, ali se tek nakon 4 dana dostiže plato. Do pada u brzini reakcije nakon 23 h može doći usled oslobađanja etanola koji je u ovom slučaju jedan od proizvoda reakcije, jer kao što je već pomenuto, etanol može da dovede do inhibicije enzima. Naime, iako nastala koncentracija etanola nije velika, u ovoj jako nepolarnoj

reakcionoj smeši može doći do sporijeg uklanjanja etanola sa enzima, odnosno povećane koncentracije ovog proizvoda u mikrokolini enzima, što može dovesti do blage inhibicije enzima i pri manjim koncentracijama etanola. Takođe, sporije uklanjanje etanola sa enzima može da doprinese otežanom pristupu oleil alkohola aktivnom centru odnosno smanjenju brzine reakcije.



Slika 4.26. Tok sinteze oleil-cinamata transesterifikacijom etil-cinamata.

### 4.3 Sinteza etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem, kinetička studija i prenos mase

Reaktori sa fluidizovanim slojem su često korišćeni u industriji zahvaljujući nizu jedinstvenih prednosti u odnosu na druge tipove kontinualnih reaktora. Naime, u poređenju sa reaktorom sa pakovanim slojem, izvođenjem reakcije u reaktoru sa fluidizovanim slojem ostvaruje se manji pad pritiska, a takođe, ne postoji opasnost od začepljenja reaktora. Međutim, glavni razlog za korišćenje reaktora sa fluidizovanim slojem je bolji prenos mase i toplote usled postizanja efikasnog mešanja između čestica i fluida. Efikasno mešanje omogućava dobar kontakt između čestica i fluida, kao i čestica i zida kolone, pa je tako omogućeno postizanje uniformne temperature, što reaktor sa fluidizovanim slojem čini najboljim izborom za izvođenje reakcija u kojima je neophodna kontrola temperature u optimalnim reakcionim uslovima [187, 188].

U ovom radu korišćen je reaktor sa fluidizovanim slojem za sintezu etil-cinamata sa Novozyme 435 u *tert*-butanolu. Fluidizacija je ostvarena uzlaznim tokom tečnosti, kao što se vidi na slici 4.27. Sve reakcije su izvedene na 55 °C, sa zapreminom reakcione



zadovoljavajući prinosi u šaržnom reaktoru. Dodatno, *terc*-butanol predstavlja bolji izbor od izooktana ukoliko se ima u vidu ekološka prihvatljivost upotrebljenog rastvarača [171]. Od posebnog je značaja činjenica da je upotreba *terc*-butanola dozvoljena u parfemima i različitim kozmetičkim proizvodima. Imajući u vidu glavnu primenu etil-cinamata, kao arome u kozmetičkim preparatima, upotrebom *terc*-butanola značajno se smanjuju troškovi prečišćavanja proizvoda.

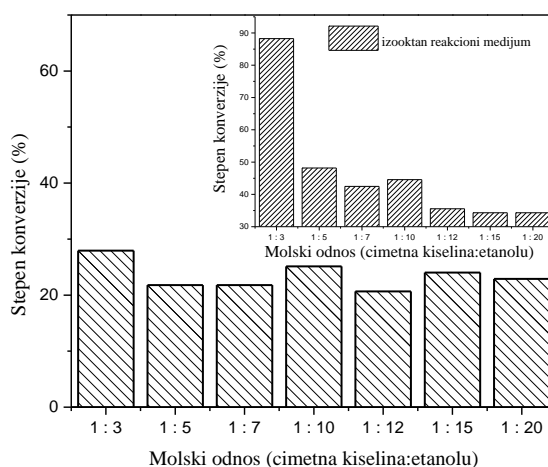
Problem male rastvorljivosti fenolnih kiselina u organskim rastvaračima predstavlja glavno ograničenje u široj primeni kontinualnih sistema u enzimskoj sintezi estara fenolnih kiselina. Jošida i saradnici su predložili konfiguraciju reaktora sa pakovanim slojem u kojem se efikasno mogu sintetisati alkil-ferulati gde je ovaj problem prevaziđen korišćenjem kolone napakovane ferulnom kiselinom koja je na red vezana sa kolonom sa enzimom, a kroz koju cirkulišu alkoholi koji su i supstrati i rastvarači u ovom sistemu [138].

Variranjem početne koncentracije reaktanata u reakciji esterifikacije može se uticati na povećanje prinosa proizvoda usled delovanja Zakona o dejstvu masa. S duge strane, prevelika koncentracija nekog od supstrata u enzimski katalizovanim reakcijama može imati i inhibitorski efekat na enzim [3, 76]. Imajući to u vidu neophodno je naći optimalnu koncentraciju reaktanata koja dovodi do maksimalnog prinosa proizvoda bez gubitka aktivnosti primenjenog enzima. Iako se molski odnos od 1:3 (n(kis):n(alk)) pokazao kao optimalan u sintezi etil-cinamata u izooktanu (poglavlje 4.2.5), izvođenje reakcije u drugom reakcionom medijumu zahteva ponovnu optimizaciju u novim reakcionim uslovima. Stoga su preliminarna istraživanja uključila ispitivanje uticaja molskog odnosa cimetine kiseline i etanola u *terc*-butanolu u šaržnom reaktoru na 55°C, 200 o/min u toku 24h. Reakcije su izvedene na 55°C, iako je temperatura od 65°C bila optimalna za izvođenje sinteze etil-cinamata u izooktanu, jer prilikom rada na temperaturi od 65°C dolazi do velikih gubitaka zapremine u reaktoru sa fluidizovanim slojem usled isparavanja rastvarača.

Kao što se vidi sa slike 4.28, najveći prinos etil-cinamata od 28% ostvaren je pri molskom odnosu od 1:3, odnosno koncentraciji cimetine kiseline od 0,17 mol/dm<sup>3</sup> i koncentraciji etanola od 0,51 mol/dm<sup>3</sup>. Višak etanola u sistemu sa izooktanom, pogoduje pomeranju ravnoteže ka stvaranju proizvoda, međutim u prevelikoj koncentraciji prevladava negativan uticaj etanola na enzim najverovatnije zbog razaranja vodenog



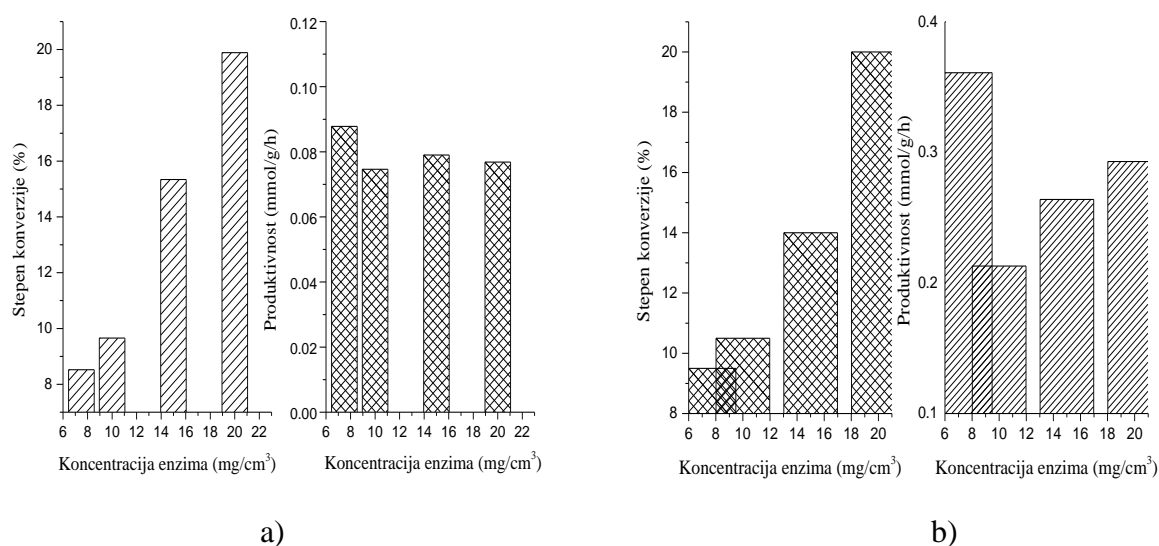
omotača oko enzima. Kada je sinteza etil-cinamata izvedena u *tert*-butanolu, inhibitorni efekat viška etanola ne dolazi do izražaja kao u sistemu sa izooktanom. Razlog je priroda samog rastvarača koji ublažava negativne efekte kratkih alkohola na enzim [189, 190]. Sva preliminarna ispitivanja u reaktoru sa fluidizovanim slojem ispitana su pri molaskom odnosu od 1:3, međutim, da bi se došlo do definitivnog zaključka da li dolazi do inhibicije supstratom u višku neophodno je ispitati kinetiku reakcije u tom sistemu i tek nakon postavljanja pravog kinetičkog modela utvrditi da li ima inhibicije i o kom je tipu inhibicije reč.



Slika 4.28. Uticaj molskog odnosa na stepen konverzije etil-cinamata u šaržnom reaktoru u sistemu sa *tert*-butanolom i izooktanom (umetnuta slika).

Nakon izbora molskog odnosa cimetne kiseline i etanola, pristupilo se optimizaciji procesnih parametara u oba bioreaktorska sistema, pre svega koncentracije enzima, kao i protoka u fluidizovanom sloju i broju obrtaja u šaržnom reaktoru. Naime, da bi se kontinualni procesi mogli uspešno implementirati u industriji neophodno je izvršiti procenu efikasnosti procesa sa aspekta njihove produktivnosti. Uticaj koncentracije enzima na sintezu etil-cinamata u oba bioreaktorska sistema ispitan je variranjem početne koncentracije enzima u opsegu od 7,5-20 mg/cm<sup>3</sup>, pri konstantnim vrednostima svih ostalih parametara. Sve sinteze su izvedene u *tert*-butanolu na 55°C pri molaskom odnosu od 1:3 i početnoj koncentraciji cimetne kiseline od 0,17 mol/dm<sup>3</sup>. Protok u reaktoru sa fluidizovanim slojem je iznosio 1,83 cm<sup>3</sup>/min, a broj obrtaja u šaržnom reaktoru 200 o/min.

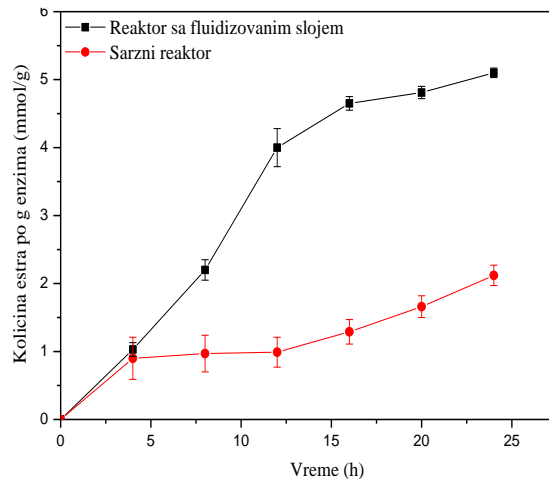
Sa slike 4.29 se vidi da stepen konverzije raste gotovo linerano sa porastom koncentracije enzima u oba bioreaktorska sistema, i da su pri istim koncentracijama enzima ostvareni približno isti stepeni konverzije za 6 h u reaktoru sa fluidizovanim slojem i 23 h u šaržnom reaktoru. Porast stepena konverzije, slično kao i u sistemu sa izooktanom gotovo linearno raste s porastom koncentracije enzima. Ovakav rezultat je očekivan s obzirom da prisustvo veće količine enzima u reakcionoj smeši obezbeđuje više aktivnih mesta za formiranje acil-enzim kompleksa, pa se samim tim povećava verovatnoća za odigravanje reakcije [122]. Međutim, kako cena enzima čini veliki deo ukupnih troškova enzimski katalizovanih procesa, produktivnost je bolji pokazatelj rentabilnosti procesa.



Slika 4.29. Uticaj koncentracije enzima na stepen konverzije i produktivnost u: a) šaržnom reaktoru; b) reaktoru sa fluidizovanim slojem

Sa slike 4.29 se vidi da je produktivnost procesa ostala ista ili je opala sa porastom koncentracije enzima u oba bioreaktorska sistema. Kao optimalna koncentracija enzima u oba sistema pokazala se koncentracija od 7,5 mg/cm<sup>3</sup>. Pri ovoj koncentraciji ostvareni su zadovoljavajući stepeni konverzije, pri maksimalnoj ostvarenoj produktivnosti enzima od 0,089 i 0,361 mmol/h/g za šaržni i reaktor sa fluidizovanim slojem respektivno.

Tok reakcije sinteze etil-cinamata praćen je u reaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom reaktoru pri koncentraciji enzima od 7,5 mg/cm<sup>3</sup> i rezultati su prikazani na slici 4.30.



Slika 4.30. Poređenje specifičnog prinosa etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom reaktoru.

Kao što se vidi u istom vremenskom periodu u reaktoru sa fluidizovanim slojem su ostvareni znatno viši specifični prinosi u odnosu na šaržni reaktor. Veća produktivnost reaktora sa fluidizovanim slojem u odnosu na šaržni reaktor po istoj masi enzima, posledica je daleko kraćeg vremena zadržavanja supstrata u odnosu na imobilisani enzim a takođe i boljeg kontakta između enzima i supstrata. Do sličnih zaključaka došli su i Šaponjić i saradnici prilikom ispitivanja sinteze pentil-oktanoata katalizovane lipazom iz *C. rugosa* imobilisanom na Sepabeads® EC-EP u reaktoru sa fluidizovanim slojem [188, 191]. Naime, autori su pokazali da se u reaktoru sa fluidizovanim slojem pri protoku od  $3 \text{ cm}^3/\text{min}$  postiže stepen konverzije od 90,2% za 14 h, dok se u šaržnom reaktoru pri istim uslovima nakon 24 h ostvaruje stepen konverzije od 72,2%. Slično, Damjanović i saradnici su pokazali veću efikasnost reaktora sa fluidizovanim slojem u poređenju sa šaržnim reaktorom u sintezi geranil-butirata katalizovanoj imobilisanom lipazom iz *C. rugosa*. U reaktoru sa fluidizovanim slojem stepen konverzije od 53,3% ostvaren je nakon 2 h pri protoku od  $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ , dok je u šaržnom reaktoru za dostizanje prinosa od  $\sim 100\%$  bilo neophodno 48 h [192]. Pokazalo se da je reaktor sa fluidizovanim slojem bolje rešenje od šaržnog reaktora i u reakciji hidrolize laktoze iz surutke pomoću LactozymT<sup>M</sup> imobilisanog na celulozna zrna, kada se za 5 h postigao stepen hidrolize veći od 90%, dok je za isti stepen hidrolize u šaržnom postignut nakon 48 h [193]. Proizvodnja fruktoze iz inulina pomoću inulinaze imobilisane na Sepabeads u reaktoru sa fluidizovanim slojem ima veliki potencijal za industrijsku primenu, iako je efikasnost reaktora nešto niža u poređenju sa šaržnim reaktorom. Naime, za kontinualnu proizvodnju fruktoze iz inulina

ovakva reaktorska konfiguracija je dobra alternativa, s obzirom da u postojećim reaktorima sa pakovanim slojem, prirodni supstrati male rastvorljivosti, poput inulina mogu da dovedu do začepjenja sistema [194].

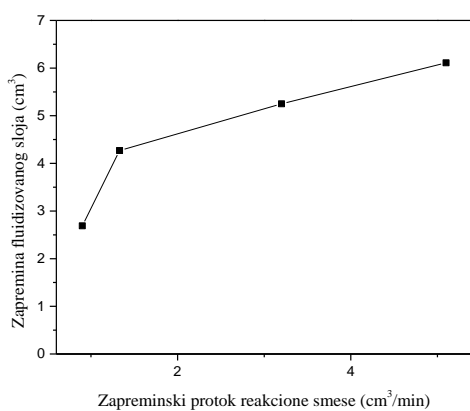
#### 4.3.1.2 Uticaj vremena zadržavanja sintezu etil-cinamata

S ciljem utvrđivanja optimalnog vremena zadržavanja reakcione smeše, pri kom bi se ostvario maksimalan stepen konverzije etil-cinamata, urađeno je nekoliko eksperimenata u kojima je variran zapreminski protok reakcione smeše. Uobičajeno je da sa povećanjem vremena zadržavanje raste stepen konverzije s obzirom da se ostvaruje duži kontakt između enzima i supstrata [192]. Protok reakcione smeše je obrnuto proporcionalan vremenu zadržavanja, kao što se vidi iz jednačine:

$$\tau_{fs} = \frac{V_{fs}}{\dot{V}} \quad (4.6)$$

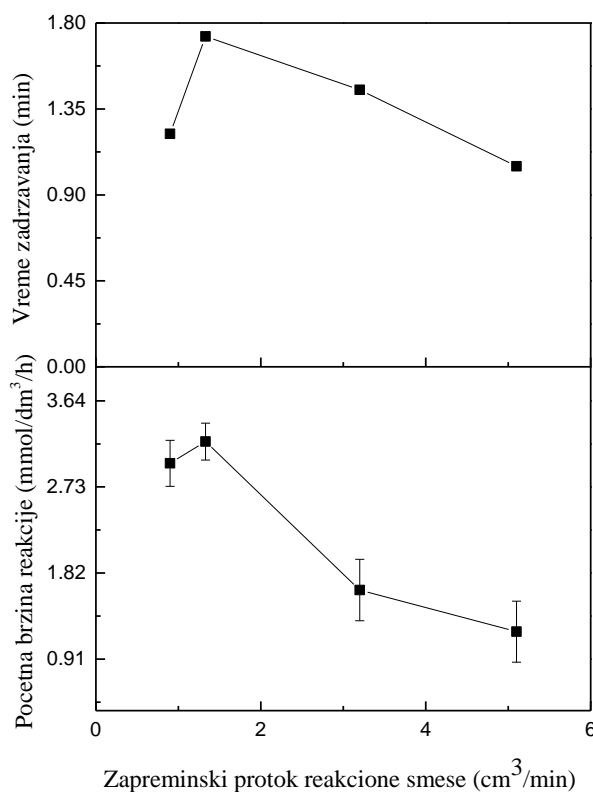
gde su:  $V_{fs}$  zapremina fluidizovanog sloja, a  $\dot{V}$  zapreminski protok reakcione smeše.

U ovom radu su ispitane vrednosti protoka od 0,9-5,1  $\text{cm}^3/\text{min}$ , čemu odgovaraju vremena zadržavanja od 3,2-1,2 min, odnosno zapremine fluidizovanog sloja od 2,7 do 6,11  $\text{cm}^3$ , kao što je prikazano na slici 4.31. Uticaj protoka reakcione smeše na stepen konverzije etil-cinamata ispitan je pri konstantnim vrednostima ostalih parametara, temperatura 55°C, koncentracija enzima od 7,5  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Sa slike 4.31 se vidi da se uzlaznim protokom reakcione smeše razvija stabilan fluidizovan sloj i da sa porastom protoka raste zapremina fluidizovanog sloja.



Slika 4.31. Uticaj zapreminskog protoka na zapreminu fluidizovanog sloja.

Na slici 4.32 se vidi uticaj protoka na vreme zadržavanja i početnu brzinu reakcije. Sa krivih se lako uočava da stepen konverzije, odnosno početna brzina reakcije raste sa porastom vremena zadržavanja. Duže vreme zadržavanja omogućava duži kontakt između enzima i supstrata i samim tim dovoljno vremena za stupanje u reakciju. Dalji porast protoka ne dovodi do porasta brzine reakcije, što ukazuje na odsustvo difuzionih limitacija. Naime, generalno se povećanjem protoka smanjuje otpor difuziji usled smanjenja graničnog sloja tj. povećanja prenosa mase. Ovakav rezultat ukazuje da je reakcija kinetički kontrolisana, tj. da prenos mase nije korak koji određuje brzinu reakcije u sintezi etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem. Takođe povećanje protoka preko  $1,33 \text{ cm}^3/\text{min}$  dovodi do smanjenja brzine reakcije, najverovatnije zbog skraćenog vremena zadržavanja koje je nedovoljno za reakciju između enzima i supstrata.



Slika 4.32. Zavisnost vremena zadržavanja i početne brzine reakcije od protoka reakcione smeše.

#### 4.3.1.3 Kinetička studija i proračun prenosa mase

Kako su eksperimenti ukazivali da je sinteza etil-cinamata u reaktoru sa fluidizovanim slojem kinetički kontrolisana reakcija, odnosno da se odvija bez difuzionih limitacija, u nastavku disertacije je izveden i proračun koji treba da potvrdi eksperimentalne zaključke. Izborom odgovarajuće brzine mešanja u šaržnom reaktoru, odnosno protoka reakcione

smeše u reaktoru sa fluidizovanim slojem smanjuje se otpor prenosu mase usled smanjenja graničnog sloja oko čestica enzima. Pri ovim uslovima izvedena je kinetička studija kako bi se odredili vrednosti maksimalnih brzina neophodne za proračun efikasnosti prenosa mase. Naime, uticaj spoljašnjeg prenosa mase na enzimsku sintezu etil-cinamata ispitan je preko Damköhler-ovog broja ( $Da$ ) u kojem figuriše maksimalna brzina reakcije, a koji se računa prema sledećoj jednačini [182, 195]:

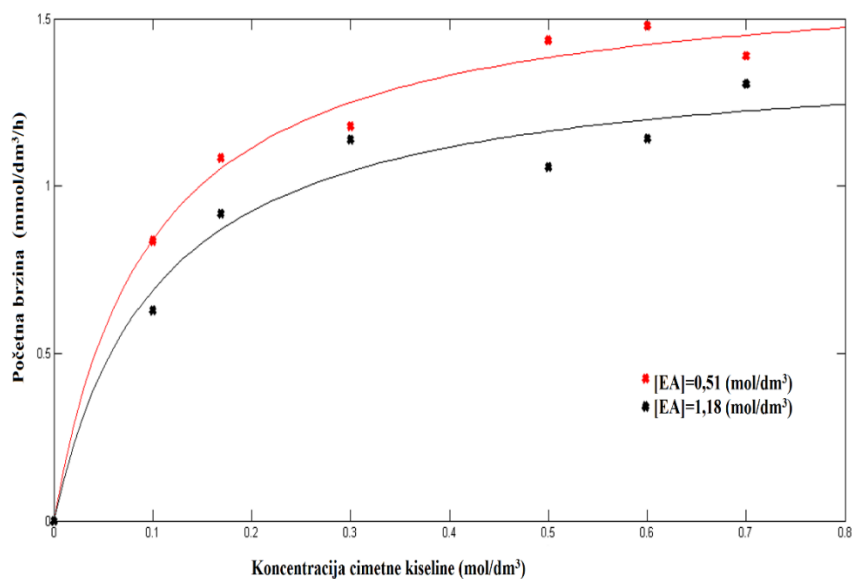
$$Da = \frac{V_m''}{k_{ct} \cdot [CK]_r} \quad (4.7)$$

gde je  $V_m''$  (mol/ (m<sup>2</sup>s)) maksimalna brzina reakcije po jedinici spoljašnje površine biokatalizatora,  $k_{ct}$  koeficijent prenosa mase tečno-čvrsto (m/s) i  $[CK]_r$ - koncentracija cimetne kiseline u rastvoru. Kako  $Da$  broj predstavlja odnos maksimalne brzine reakcije i maksimalne brzine difuzije, u sistemima u kojima je  $Da \ll 1$  spoljašnji otpor prenosu mase je zanemarljiv i smatra se da je reakcija kinetički kontrolisana. S druge strane, u slučaju kada je  $Da \gg 1$  reakcija je određena brzinom spoljašnjeg prenosa mase usled postojanja difuzionih limitacija.

Kao što se vidi iz jed. 4.7 da bi se potvrdila hipoteza o odigravanju reakcije bez spoljašnjeg otpora prenosu mase, neophodno je izračunati koeficijent prenosa mase i odrediti maksimalnu brzinu reakcije uspostavljanjem odgovarajućeg kinetičkog modela. S tim u cilju izvedena je serija eksperimenata u oba reaktorska sistema u kojima je pri optimalnoj koncentraciji enzima od 7,5 mg/cm<sup>3</sup> varirana koncentracija oba supstrata i to cimetne kiseline u opsegu od 0,1-0,7 mol/dm<sup>3</sup> i etil alkohola u opsegu od 0,1-2,51 mol/dm<sup>3</sup>. Reakcije su izvedene na 55°C pri čemu su zapremine reakcionih smeša iznosile 5 odnosno 50 cm<sup>3</sup> za šaržni, odnosno reaktor sa fluidizovanim slojem. Kao što je već ranije utvrđeno, optimalna brzina mešanja je 200 o/min (poglavlje 4.2.3), a zapreminski protok fluidizovanog sloja od 1,82 cm<sup>3</sup>/min. Naime, iako su pri zapreminskom protoku od 1,33 cm<sup>3</sup>/min dobijene najveće početne brzine, fluidizovan sloj je bio dosta stabilniji pri protoku od 1,82 cm<sup>3</sup>/min, pri kom su i vrednosti početnih brzina bile visoke pa je uzet kao optimalni za dalje reakcije.

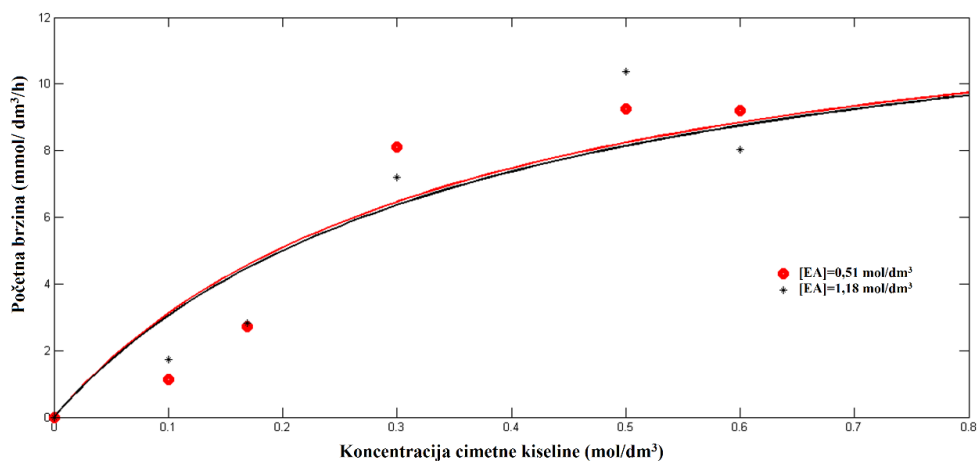
Na slici 4.33 se vidi da u šaržnom reaktoru sa porastom koncentracije alkohola dolazi do blagog pada u početnoj brzini reakcije, pa ovakav rezultat ukazuje na postojanje inhibicije alkoholom, o čemu je već bilo reči. Zbog ovakve zavisnosti brzine reakcije od

koncentracije alkohola za dobijanje kinetičkog modela sinteze etil-cinamata u šaržnom reaktoru su korišćeni bisupstratni modeli koji uključuju inhibiciju alkoholom.



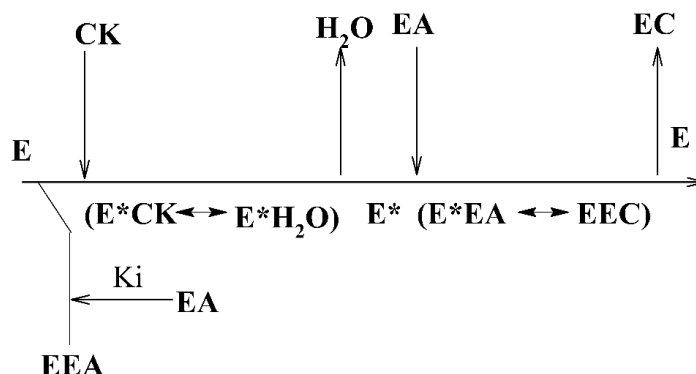
Slika 4.33. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije cimetne kiseline za dve koncentracije alkohola u šaržnom reaktoru.

S druge strane u reaktoru s fluidizovanim slojem, ne dolazi do ovakvog pada početnih brzina reakcije sa porastom koncentracije etanola (Slika 4.34) pa su za dobijanje kinetičkog modela u ovom bioreaktoru korišćeni modeli koji ne uključuju inhibiciju alkoholom.



Slika 4.34. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije cimetne kiseline za dve koncentracije alkohola u reaktoru s fluidizovanim slojem.

Prema literaturnim podacima, većina enzimskih reakcija esterifikacije i transesterifikacije se odvija po ping-pong bi-bi modelu koji je prikazan na slici 4.35.



Slika 4.35. Šematski prikaz ping-pong bi-bi modela sa inhibicijom alkoholom.

Kao što se vidi na slici 4.35 koja predstavlja tipičan tok reakcije esterifikacije, enzim može da se veže sa cimetnom kiselinom, pri čemu nastaje produktivni acil enzim kompleks, ili sa alkoholom, pri čemu nastaje tzv. "dead-end" za koji se dalje ne može vezati kiselina pa dolazi do inhibicije enzima. U slučaju formiranja acil-enzim kompleksa, reakcija se nastavlja normalnim tokom, pri čemu formirana voda napušta aktivni centar. Nakon toga ulaskom etanola u aktivni centar kreće deacilovanje enzima i stvaranje proizvoda, etil-cinamata, čijim se izlaskom iz aktivnog centra reakcija završava, a slobodan enzim postaje spreman za novu reakciju. Ovakav tok predstavlja osnovni ping-pong bi-bi model koji se opisuje sledećom jednačinom:

$$v_0 = \frac{v_{\max}[CK]_0[EA]_0}{K_{EA}[CK]_0 + K_{CK}[EA]_0 + [CK]_0[EA]_0} \quad (4.8)$$

gde su  $[CK]_0$  i  $[EA]_0$  početne koncentracije cimetne kiseline i alkohola,  $K_{EA}$  i  $K_{CK}$  su Michaelis-Mentenove konstante za etil alkohol i cimetnu kiselinu respektivno.

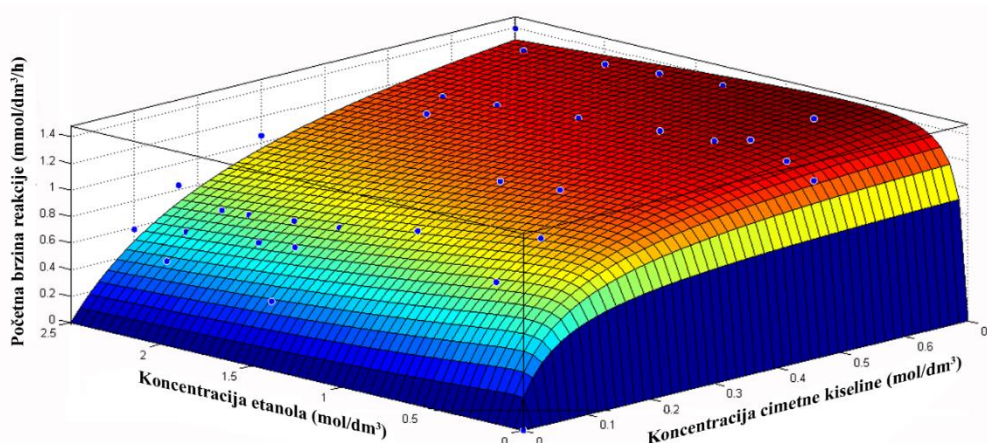
U slučaju formiranja "dead-end" kompleksa, za definisanje brzine reakcije je neophodan dodatan parametar, odnosno konstanta inhibicije etanolom ( $K_{iEA}$ ), pa jednačina koja opisuje ping-pong bi-bi model sa inhibicijom glasi:

$$v_0 = \frac{v_{\max}[CA]_0[EA]_0}{K_{EA}[CA]_0 + K_{CA}[EA]_0 \left(1 + \frac{[EA]_0}{K_{iEA}}\right) + [CA]_0[EA]_0} \quad (4.9)$$

Pored pomenutih modela podaci dobijeni u kinetičkim eksperimentima su modelovani i sa drugim modelima za bisupstratne enzimске reakcije, ali su dobijena loša



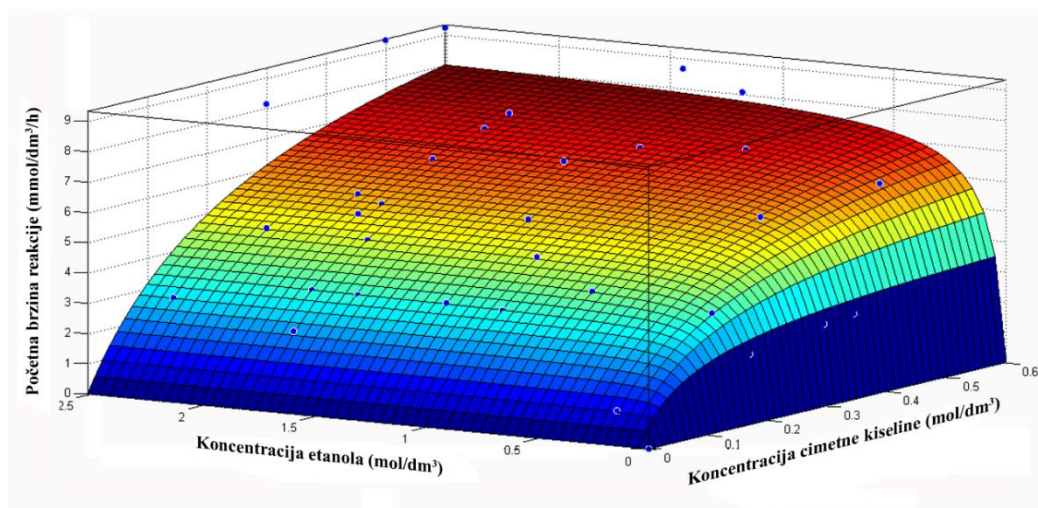
slaganja modela i eksperimentalnih podataka pa su zato prikazani samo modeli koji su korišćeni u daljem radu. Eksperimentalni rezultati su u Matlabu modelovani prikazanim jednačinama kako bi se dobile vrednosti nepoznatih konstanti.



Slika 4.36. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije supstrata u šaržnom reaktoru.

Na slici 4.36 su prikazane eksperimentalno dobijene i modelovane vrednosti početne brzine reakcije u šaržnom reaktoru. Iz prikazanih rezultata se jasno vidi da u ispitivanom opsegu cimetna kiselina nije pokazala inhibitorni uticaj na enzimsku aktivnost. Porast koncentracije cimetne kiseline do  $0,6 \text{ mol/dm}^3$  doveo je do porasta početnih brzina reakcije, nakon čega dalje povećanje koncentracije cimetne kiseline nije imalo efekat na početnu brzinu reakcije. S druge strane, s porastom koncentracije alkohola do nekih  $0,25 \text{ mol/dm}^3$  raste početna brzina reakcije, dok je dalje povećanje koncentracije alkohola dovelo do blagog pada početnih brzina reakcije. Dobijena vrednost koeficijenta determinacije od  $R^2=0,97$ , ukazuje na odlično slaganje modela i eksperimentalnih podataka.

S druge strane, kao što je prikazano na slici 4.37, u reaktoru s fluidizovanim slojem se ne uočava pad u ostvarenim početnim brzinama sa porastom koncentracije alkohola. S porastom koncentracije kiseline, početna brzina reakcije raste u čitavom ispitivanom opsegu, dok s porastom koncentracije alkohola, brzina reakcije raste do koncentracije od  $0,5 \text{ mol/dm}^3$ , nakon čega dolazi do blagog rasta sa daljim porastom koncentracije alkohola. Dobijena vrednost koeficijenta determinacije od  $R^2=0,91$ , ukazuje na dovoljno dobro slaganje modela i eksperimentalnih podataka.



Slika 4.37. Zavisnost početne brzine reakcije od koncentracije supstrata u šaržnom reaktoru.

Iz dobijene vrednosti za konstantu inhibicije u šaržnom reaktoru (tabela 4.7) se vidi da je reč o umerenoj inhibiciji, odnosno da etanol nije jak inhibitor lipaze u *tert*-butanolu s obzirom da je vrednost konstante vrlo viška u poređenju sa drugim literaturnim vrednostima konstanti inhibicije [3, 131, 196]. Takođe se vidi da su konstante specifičnosti za oba supstrata dosta veće u reaktoru sa fluidizovanim slojem u odnosu na šaržni reaktor, pa je očekivano da su bolji rezultati ostvareni u ovom reaktorskom sistemu.

Tabela 4.7. Vrednosti dobijenih kinetičkih konstanti za šaržni i bioreaktor sa fluidizovanim slojem

Kinetički parametar	Šaržni bioreaktor	Bioreaktor sa fluidizovanim slojem
$V_{ma}$ , mmol/(dm <sup>3</sup> h)	1,825	12
$K_{CK}$ , mol/dm <sup>3</sup>	0,0947	0,2784
$K_{EA}$ , mol/dm <sup>3</sup>	0,0402	0,09169
$K_{iEA}$ , mol/dm <sup>3</sup>	1,374	-
$K_{s,CK} \cdot 10^3$ , dm <sup>3</sup> / (g h)	2,6	5,8
$K_{s,EA} \cdot 10^3$ , dm <sup>3</sup> / (g h)	6,1	17,3

Nakon određivanja kinetičkih modela u oba reaktorska sistema, pristupilo se određivanju koeficijenta prenosa mase. U šaržnom reaktoru su za ovaj proračun korišćene sledeće jednačine:

$$k_{\text{čt}} \cdot \text{Sc}^{\frac{2}{3}} = 0.13 \cdot \left[ \frac{\left(\frac{P}{V_r}\right) \cdot \mu}{\rho^2} \right]^{\frac{1}{4}} \quad (4.10)$$

Sc-je Šmitov broj,  $\mu$  – dinamički viskozitet rastvarača,  $\rho$ -gustina rastvarača, gde je  $P/V_r$  parametar koji se obično koristi kod reaktora sa mehaničkim mešalicama, međutim nedavno je grupa autora definisala ovaj parametar i za mešanje u orbitalnim šejkerima. Izračunavanje ovog parametra vrši se pomoću sledećih jednačina: 4.11-(4.14 [181, 197].

$$\frac{P}{V_r} = \varepsilon \cdot \rho \quad (4.11)$$

$$\varepsilon = N_e' \cdot n^3 \cdot d^4 \cdot V_r^{-2/3} \quad (4.12)$$

$$N_e' = 75 \cdot \text{Re}^{-1} + 25 \cdot \text{Re}^{-0.6} + 1.5 \cdot \text{Re}^{-0.2} \quad (4.13)$$

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot n \cdot d^2}{\mu} \quad (4.14)$$

$$\text{Sc} = \frac{\mu \cdot \rho}{D} \quad (4.15)$$

gde je  $N_e'$ -modifikovani faktor snage;  $n$ -broj obrtaja mešalice;  $d$ -unutrašnji prečnik erlenmajera;  $\varepsilon$ -energija disipacije; Re-Rejnoldsov broj za erlenmajer;  $V_r$ -zapremina reakcione smeše.

S druge strane u reaktoru sa fluidizovanim slojem, koeficijent prenosa mase je izračunat korišćenjem sledećih jednačina 4.16-4.18:

$$\text{Sh} = 0.23 \cdot \text{Ar}^{1/3} \cdot \text{Sc}^{0.4} \quad (4.16)$$

$$\text{Ar} = \frac{g \cdot d_{\text{č}}^3 \cdot \rho \cdot (\rho_{\text{č}} - \rho)}{\mu^2} \quad (4.17)$$

$$\text{Sh} = \frac{k_{\text{čč}} \cdot d_{\text{č}}}{D} \quad (4.18)$$

gde je Sh-Šervudov broj, Ar-je Arhimedov broj, I gde su  $d_{\text{č}}$  i  $\rho_{\text{č}}$  prečnik i gustina čestice biokatalizatora, a  $D$  difuzivnost supstrata.

Za izračunavanje koeficijenta prenosa mase iz Šmitove (jed. 4.15) i Šervudove (jed. 4.18) jednačine neophodno je izračunati difuzivnost supstrata u rastvaraču, što je u ovom slučaju urađeno pomoću Wilke-Chang jednačine 4.19 [198]

$$D = \frac{7.4 \cdot 10^{-8} \cdot \sqrt{\varphi \cdot M \cdot T}}{V_{CK}^{0,6} \cdot \mu} \quad (4.19)$$

gde je  $\varphi$  - faktor asocijativnosti rastvarača,  $M$ - molarna masa rastvarača,  $T$ - temperatura reakcije, i  $V$ - molarna zapremina supstrata na temperaturi ključanja. Sve navedene vrednosti za *terc*-butanol na radnoj temperaturi (328 K) su nađene u literaturi i iznose:  $\varphi=1$ ,  $M=74,12$  g/mol,  $\mu=1$  mPas [199].  $V_{CK}$  za cimetnu kiselinu, je takođe pronađen u literaturi i iznosi  $125,3$  cm<sup>3</sup>/mol [200]. Svi proračuni su rađeni sa cimetnom kiselinom, jer je to supstrat koji učestvuje u stvaranju acil-enzim kompleksa. Dobijene vrednosti hidrodinamičkih parametara su prikazane u tabeli 4.8.

*Tabela 4.8. Vrednosti hidrodinamičkih parametara u oba bioreaktora.*

Hidrodinamički parametri			
Šaržni bioreactor		Bioreaktor s fluidizovanim slojem	
$\rho$ , kg/m <sup>3</sup>	781,2	$\rho_{\xi}$ , kg/m <sup>3</sup>	1070
$d$ , m	0,065	$d_{\xi}$ , m	$5,35 \cdot 10^{-4}$
$n$ , o/s	3,33	$k_{t\check{c}}$ , m/s	$5,46 \cdot 10^{-5}$
$V_r$ , m <sup>3</sup>	$5 \cdot 10^{-6}$		
$\mu$ , Pa s	$1 \cdot 10^{-3}$		
$D_{CA}$ , m <sup>2</sup> /s	$1,153 \cdot 10^{-9}$		
$k_{t\check{c}}^a$ , m/s	$3,80 \cdot 10^{-5}$		

Vrednosti specifične površine Novozyme 435, kao i nasipna gustina nađene su u literaturi i iznose  $82,6$  m<sup>2</sup>/g [201], odnosno  $0,43$  g/cm<sup>3</sup> [202]. Koristeći ove parametre i dobijenu vrednost brzine iz kinetičkog modela, vrši se aproksimacija proračuna maksimalne brzine reakcije po jedinici spoljašnje površine biokatalizatora i dolazi do vrednosti  $D_A$  brojeva, koje su prikazane u tabeli 4.9. Kao što se vidi iz jednačine (4.7 za izračunavanje  $D_A$ , najveća vrednost ovog broja se očekuje pri najmanjoj koncentraciji supstrata i ona u je u oba bioreaktora daleko manja od 1, što znači da ne postoje spoljašnji otpori prenosu mase, odnosno da je rakcija kinetički kontrolisana. Treba napomenuti da neki autori koeficijent prenosa mase računaju koristeći granični Šervudov broj, odnosno  $Sh=2$ , kada se smatra da čestice miruju i da se prenos mase odvija samo putem prirodne konvekcije. Čak i u ovom slučaju su izračunate vrednosti  $Da \ll 1$ , odnosno nema

difuzionih limitacija. Imajući u vidu ove rezultate može da se smatra da su oba bioreaktorska sistema postignuti uslovi koji omogućavaju dovoljno brz prenos supstrata kroz reakcioni medijum, pa su reakcije kinetički kontrolisane.

Tabela 4.9. Vrednosti  $Da$  i  $\Phi_A$  u oba bioreaktorska sistema

Šaržni bioreaktor		Bioreaktor s fluidizovanim slojem	
$Da \cdot 10^8$	$\Phi_A \cdot 10^3$	$Da \cdot 10^8$	$\Phi_A \cdot 10^2$
21,8	19,30	9,96	6,24

S obzirom da je CALB imobilisana i u unutar pora jonoizmenjivačke smole, pored spoljašnjeg otpora prenosu mase, neophodno je eliminisati i unutrašnji otpor prenosu mase. Da bi se to uradilo, izračunate su vrednosti Tielovog modula prema sledećim jednačinama [182]:

$$\Phi = \frac{v_r}{D_{\text{eff}} \cdot [CK]_0} \cdot \left(\frac{R}{3}\right)^2 \quad (4.20)$$

$$D_{\text{eff}} = D \cdot \frac{\varepsilon_p}{\tau} \quad (4.21)$$

gde je  $v_r$ -izmerena brzina reakcije,  $R$ -poluprečnik čestice Novozyme 435,  $\varepsilon_p$ -poroznost Novozyme 435 i  $\tau$ - tortuoznost ili uvijenost unutrašnjih pora. Vrednost  $\frac{\varepsilon_p}{\tau}$  odnosa za Novozyme 435 je nađena u literaturi i iznosi 0,25 [199]. Difuzivnost supstrata unutar čestica imobilizata razlikuje se od difuzivnosti u reakcionom medijumu, jer je samo deo čestice imobilisanog enzima sačinjen od pora a samim tim na raspolaganju za difuziju supstrata [182].

Za vrednosti  $\Phi \leq 0,3$  se smatra da se reakcija odvija bez unutrašnjih otpora prenosu mase. Kako su najveće izračunate vrednosti Tielovog modula iznosile  $19,30 \cdot 10^{-3}$  u šaržnom biorakтору, odnosno  $6,24 \cdot 10^{-2}$  u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem, može da se smatra da se sinteza etil-cinamata u oba reaktorska sistema odvija bez unutrašnjih difuzionih limitacija, odnosno da je sinteza etil-cinamata kinetički kontrolisana.

## 4.4 Optimizacija enzimske sinteza estara ferulne kiseline

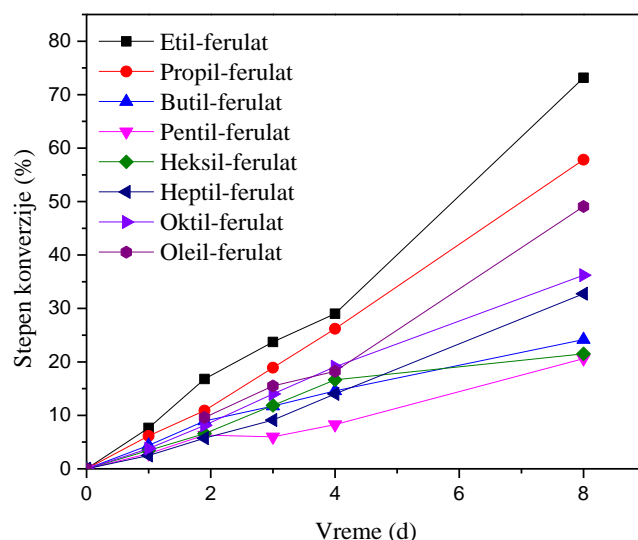
Ferulna kiselina postaje predmet brojnih bioloških i medicinskih studija, nakon što je grupa japanskih naučnika pokazala da steiril-ferulati izolovani iz pirinčanog ulja poseduju antioksidativna svojstva. Sada je poznato da ferulna kiselina poseduje širok spektar bioloških funkcija koje uključuju antioksidativnu, antialergijsku, antiinflamatornu, antikancerogenu i hepaprotektivnu aktivnost, a koristi se i kao fotoprotektivni reagens u kremama za sunčanje i umrežavajući agens u očuvanju hrane [203].

### 4.4.1 Uticaj acil akceptora na stepen konverzije ferulne kiseline

U ovom radu ispitana je i mogućnost sinteze alifatičnih estara ferulne kiseline kako bi se povećala njena rastvorljivost u uljanim formulacijama, tj. primena u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. S tim u cilju izvedena je sinteza različitih estara ferulne kiseline, gde su kao nukleofili korišćeni alifatični alkoholi sa 2-18 ugljenikovih atoma i svakom je određena antioksidativna aktivnost pomoću DPPH metode. Pored alifatičnih alkohola, kao nukleofil je korišćen i aromatični alkohol eugenol, koji i sam poseduje niz bioloških funkcija.

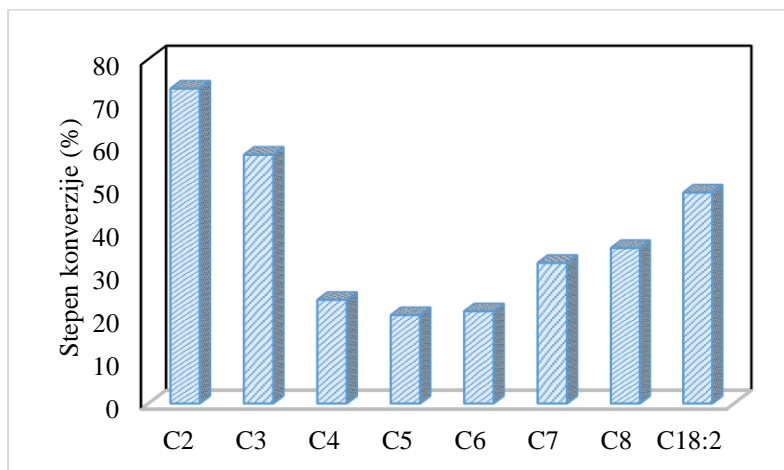
Reakcije su izvedene na 65°C, jer se u početnim ispitivanjima pokazalo da je stepen konverzije oleil-ferulata na 55°C iznosio svega 20% nakon 7 dana reakcije (poglavlje 4.1.1), dok se u sintezi estara cimetine kiseline pokazalo da stepen konverzije raste sa porastom temperature. Koncentracija kiseline je bila 50 mmol/dm<sup>3</sup>, dok je koncentracija alkohola 0,17 mol/dm<sup>3</sup>. Reakcija je izvedena u izooktanu pri velikom molskom odnosu, 33, (n(alk):n(kis)), jer je sinteza estara ferulne kiseline pri manjim molskim odnosima, koji su se pokazali kao optimalni u sintezi etil- i oleil-cinamata, izostala. Takođe, sinteza estara ferulne kiseline ispitana je i u: *tert*-butanolu i smeši *tert*-butanola i izooktana, ali su ostvareni stepeni konverzije bili zanemarljivi. Ovaj podatak je interesantan, jer bi se očekivalo da će zbog bolje rastvorljivosti u polarnim rastvaračima ostvareni stepeni konverzije biti veći u odnosu na nepolarni izooktan. Slično su pokazali i Katsoura i saradnici [88].

Na slici 4.38 je prikazan tok esterifikovanja ferulne kiseline alifatičnim alkoholima sa različitim brojem ugljenikovih atoma pomoću Novozyme 435 u izooktanu.



Slika 4.38. Tok sinteze različitih estara ferulne kiseline.

Sa slike 4.38 se vidi da je svaki od estara moguće sintetisati u ovim uslovima, ali ostvareni stepeni konverzije variraju u opsegu od 27-73%. Jasno se uočava da sintezu etil-, pentil- i oleil-ferulata karakteriše period u kom dolazi do smanjenja brzine u odnosu na početnu brzinu reakcije. Do smanjenja brzine kod sinteze etil- i oleil-ferulata dolazi između 3. i 4. dana reakcije, dok je u sintezi pentil-ferulata ovaj period nešto duži i traje od 2-4. dana reakcije. Nakon ovog perioda dolazi do rasta brzine reakcije koja je nakon 4. dana u blagom porastu u odnosu na početnu brzinu reakcije. Sintezu ostalih estara karakteriše isti tok reakcije gde je stepen konverzije u stalnom porastu za sve vreme trajanje reakcije, izuzev kod heksil-ferulata gde dolazi do blagog pada brzine reakcije nakon 4. dana. Sinteza eugenol-ferulata nije prikazana na slici 4.38, jer proizvod nije detektovan ni nakon 8 dana reakcije. Na slici 4.39 je prikazana zavisnost stepena konverzije nakon 8 dana reakcije od dužine ugljeničnog lanca alifatičnog alkohola.



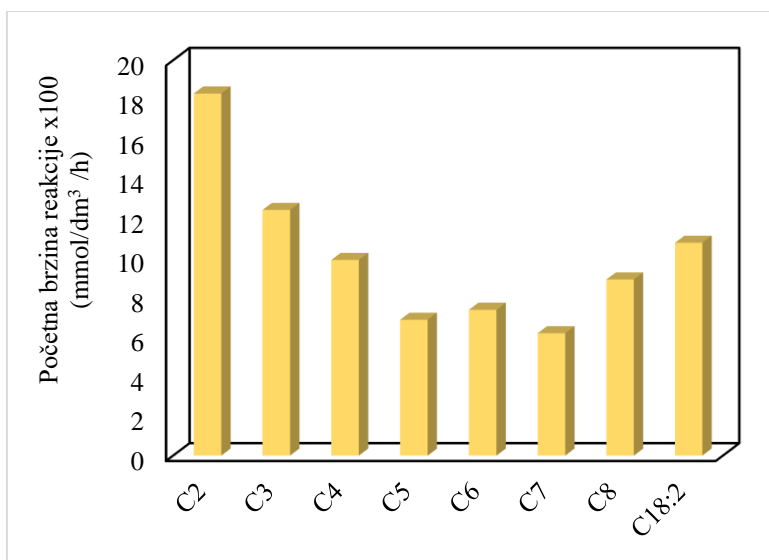
Slika 4.39. Uticaj dužine lanca alifatičnih alkohola na stepen konverzije.

Sa slike 4.39 se može uočiti da dužina lanca alifatičnog alkohola ima veliki uticaj na prinos estara ferulne kiseline u izooktanu. Najveći stepen konverzije je ostvaren sa etanolom, 76 %, dok su najmanji stepeni konverzije postignuti sa alkoholima srednjeg lanca C4-C6. Porast broja ugljenikovih atoma iznad C6 dovodi do ponovnog porasta stepena konverzije, koji za oleil alkohol iznosi 49%. Interesantno je da se dobijeni rezultat razlikuje od rezultata dobijenih u sintezi alifatičnih estara cimetine u prethodnom delu disertacije. Iako je u oba eksperimenta korišćen isti preparat lipaze B, Novozyme 435, afinitet enzima prema alkoholima se razlikuje u zavisnosti od kiselinskog supstrata. Kako je aktivni centar lipaze B uzak i dubok, a sastoji se iz dva kanala u koja se smeštaju kiselinski odnosno alkoholni supstrat, jasno je da će afinitet lipaze prema alkoholu zavisiti od strukture kiseline koja se prva smešta u aktivni centar. Alkoholi kratkog lanca mogu lako da se smeste u alkoholni džep aktivnog centra, pa su slično kao i u slučaju cimetine kiseline dobri acil akceptori. Inhibicija viškom etanola ne dolazi do izražaja kao u slučaju cimetine kiseline, jer je rastvorljivost ferulne kiseline u izooktanu manja u odnosu na cimetnu kiselinu, pa je efekat solvatacije supstrata dominantniji. Bolji prinos sa oleil alkoholom u odnosu na alkohole srednje dužine ugljeničnog niza, može biti posledica nelinearnog oblika oleil alkohola koji kao takav lakše može da se upakuje u aktivni centar enzima, jer ne dolazi do značajnog menjanja konformacije enzima prilikom vezivanja alkohola za acil-enzim kompleks. Iako je kanal u koji se smešta alkoholni supstrat u aktivnom centru enzima manje prostran od kanala u koji se smešta kiselinski supstrat pa se očekuje da lipaza B pokazuje veću specifičnost prema alkoholnim supstratima [156, 184], u ovom radu se pokazalo da je specifičnost Novozyme 435 prema kiselinskim



supstratima više izražena. Međutim, vidi se da se specifičnost Novozyme 435 prema alifatičnim alkoholima razlikuje u zavisnosti od primenjenog acil akceptora, tj. da su razlike u afinitetu prema alifatičnim alkoholima više izražene u slučaju ferulne kiseline prema kojoj Novozyme 435 pokazuje manji afinitet nego prema nesupstituisanoj cimetnoj kiselinu. S obzirom na oblik aktivnog centra ove lipaze, može se pretpostaviti da se alkoholi lakše uklapaju u aktivni centar sa voluminoznom ferulnom kiselinom. Imajući u vidu oblik aktivnog centra lipaze B, jasno je da je eugenol neadekvatan supstrat za ovaj enzim, kao što je već pomenuto kod sinteze estara cimetne kiseline.

Na slici 4.40 je prikazana zavisnost početne brzine reakcije sinteze estara ferulne kiseline i alkohola različite dužine ugljeničnog niza. Najveća početna brzina od  $18,8 \cdot 10^{-2}$  mmol/dm<sup>3</sup>/h ostvarena je u sintezi etil-ferulata. Povećanje dužine lanca alkohola dovodi do smanjenja vrednosti početnih brzina. Razlog ove pojave verovatno je otežana difuzija molekula alkohola ka aktivnom centru i proizvoda reakcije od aktivnog centra. Međutim, do odstupanja od ovog trenda dolazi kod alkohola sa najdužim ugljeničnim nizom, oktil i oleil alkohola, kada dolazi do blagog porasta početnih brzina. Ovakvo ponašanje može biti posledica bolje rastvorljivosti pomenutih alkohola u izookatnu, pa je i njihova koncentracija u mikrookolini enzima veća, a samim tim i reakcija brža. Katsoura i saradnici su prijavili sličan trend u sintezi estara ferulne kiseline u jonskoj tečnosti [bmim]PF<sub>6</sub>, pri čemu nije uočen skok u vrednosti početne brzine sa oktanolom, dok sinteza oleil-ferulata nije ispitana [88].

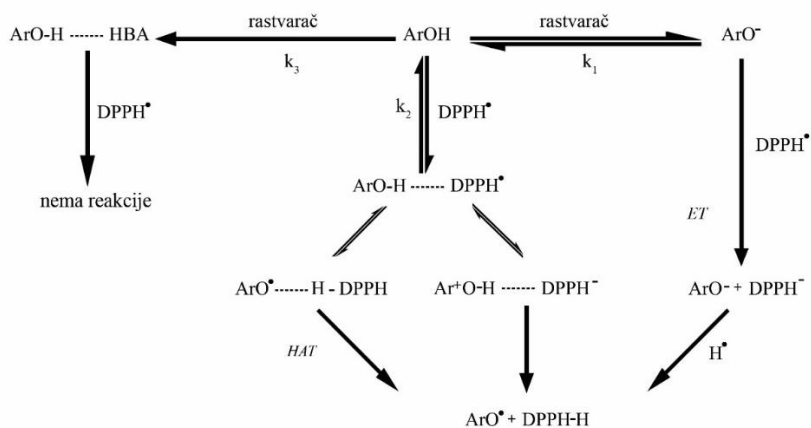


Slika 4.40. Uticaj dužine lanca alifatičnih alkohola na početnu brzinu reakcije.

#### 4.4.2 Određivanje antioksidativne aktivnosti ferulnih estara

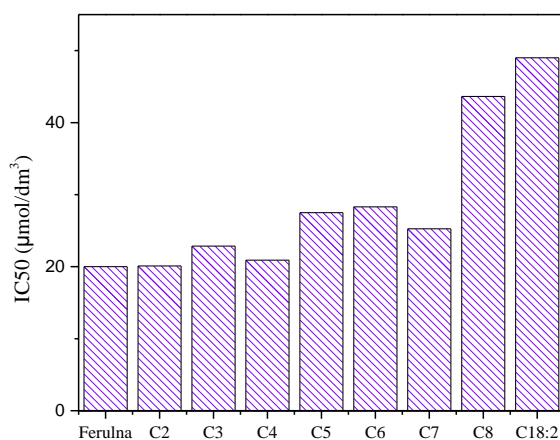
Antioksidativna aktivnost estara ferulne kiseline ispitana je DPPH metodom, jer se smatra da je glavni mehanizam njihovog antioksidativnog delovanja upravo hvatanje slobodnih radikala [204]. Za antioksidativnu aktivnost ferulne kiseline i njenih estara odgovorene su tri funkcionalne karakteristike molekula, pre svega prisustvo elektron-donorskih grupa na aromatičnom prstenu, zatim karboksilna grupa sa susednom nezasićenom C-C vezom koja može da predstavlja dodatno mesto za napad slobodnih radikala čime se sprečava njihov napada na membranu, i na kraju karboksilna grupa koja služi kao sidro kojim se vezuje za lipidni dvosloj pružajući zaštitu od lipidne peroksidacije.

Ferulna kiselina i njeni estri mogu da reaguju sa molekulom DPPH preko dva različita mehanizma i to: HAT ili ET kao što je prikazano na slici 4.41 [23, 173]. Za razliku od cimetine kiseline, ET ( $k_1$ ) je favorizovan mehanizam u slučaju ferulne kiseline s obzirom na hidroksilnu grupu na benzenovom prstenu, međutim, reakcija dosta zavisi od izbora reakcionog medijuma. Rastvarači koji mogu da prime proton (HBA- Hydrogen bond accepting) pomažu stabilizaciji nastalog fenoksilnog anjona i tako ubrzavaju proces, ali takođe mogu da blokiraju supstrat u ( $k_3$ ), pri čemu on postaje neaktivan prema DPPH, pa je izbor rastvarača bitan da bi se našao kompromis između ovih suprotnih zahteva [2, 23]. U literaturi se za ispitivanje antioksidativne aktivnosti fenolnih kiselina i estara DPPH testom najčešće koriste metanol i etanol, koji mogu lako da rastvore ferulnu kiselinu i da pospeše ET mehanizam [116, 157, 205]. Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu prikazani su na slici 4.42.



Slika 4.41. Mehanizam reakcije ferulne kiseline sa DPPH [2, 23, 173].

Kao što se vidi na slici 4.42, antioksidativna aktivnost estra ferulne kiseline manja je od antioksidativne aktivnosti same kiseline, i opada sa porastom dužine alkil niza estra. Ovo smanjenje antioksidativne aktivnosti je najverovatnije posledica smanjene reaktivnosti hidroksilne grupe prema reakcijama ET zbog prisustva elektron-donorske alkil grupe u bočnom nizu, što za posledicu ima smanjenu antioksidativnu aktivnost. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima [26, 173, 204]. Velika razlika u IC50 vrednostima oleil- i oktil-ferulata u odnosu na ostale estre može da bude posledica lošijeg rastvaranja ovih estara u metanolu, čime se utiče na ukupan ishod reakcije [173].



Slika 4.42. IC50 vrednosti estara ferulne kiseline.

Kako su sa etil-ferulatom postignuti najbolji stepen konverzije, a ujedno ovaj estar ima neznatno manju antioksidativnu aktivnost od ferulne kiseline, u daljem radu izvršena je optimizacija sinteze etil-ferulata. Takođe, etil-ferulat pored antioksidativnih ima i antiinfalatorno dejstvo i smatra se interesantnim za terapiju neurodegenerativnih poremećaja [206].

Dalja optimizacija sinteze etil-ferulata izvršena je primenom Boks-Benken eksperimentalnog plana i RSM-a koji su korišćeni za određivanje optimalnih vrednosti relevantnih faktora reakcije esterifikacije (početna koncentracija limitirajućeg supstrata, molskog odnosa supstrata i mase enzima) u cilju postizanja što većeg stepena konverzije ferulne kiseline, ali i prinosa i specifične aktivnosti enzima. Eksperimentalni faktori su ispitani u sledećim opsezima vrednosti: početna koncentracija ferulne kiseline  $X_1$  (20-80 mmol/dm<sup>3</sup>), početni molski odnos supstrata  $X_2$  (n(alk):n(kis), 3-30), masa enzima  $X_3$  (20-100 mg). Stvarne i kodirane vrednosti eksperimentalnih faktora prikazane su u Tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Kodirane i stvarne vrednosti parametra u primenjenom eksperimentalnom planu.

Faktori	Kodirane vrednosti		
	-1	0	1
Početna koncentracija ferulne kiseline, $X_1$ (mmol/dm <sup>3</sup> )	20	50	80
Mol. odnos supstrata, $X_2$	1:3	1:16,5	1:30
Masa enzima, $X_3$ (mg)	20	60	100

Eksperimenti predviđeni eksperimentalnim planom (17 eksperimenata, od kojih 5 predstavljaju centralnu tačku) izvedeni su nasumičnim rasporedom da bi se eliminisale eventualne sistematske greške eksperimenta, a tokom izrade eksperimenta su praćene tri izlazne veličine: stepen konverzije (%), prinos reakcije (mmol/dm<sup>3</sup>) i specifična enzimaska aktivnost (IU/g). Eksperimentalni podaci su modelovani jednačinom drugog reda koja uključuje efekte linearnih i kvadratni članova, kao i interakcije između ispitivanih promenljivih.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \quad (4.22)$$

gde su  $x_i, x_{ji}, x_i, x_{jj} \dots x_i, x_{jk}$  nezavisne promenljive (koncentracija ferulne kiseline, molski odnos i masa enzima),  $y$  ispitivana odzivna veličina (stepen konverzije, prinos i enzimaska aktivnost),  $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  su koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijenti regresije. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička signifikantnost se određuju korišćenjem statističkog softvera Design Expert Statistical Software 8.0.7.1 (Stat Ease Inc., Mineapolis, SAD). Primenjeni eksperimentalni plan i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Boks-Benken eksperimentalni plan za ispitivanje uticaja tri faktora na tri nivoa vrednosti metodom odzivnih površina i dobijeni rezultati.

Broj eksp	$X_1$ (mmmol/dm <sup>3</sup> )		$X_2$		$X_3$ (mg)		$Y_1$ (%)	$Y_2$ (mmol/dm <sup>3</sup> )	$Y_3$ (IU/g)
1	20	(-1)	3	(-1)	60	(0)	83,5	16,69	0,072
2	80	(1)	3	(-1)	60	(0)	51,3	41,00	0,178
3	20	(-1)	30	(1)	60	(0)	97,8	19,57	0,085
4	80	(1)	30	(1)	60	(0)	59,4	47,51	0,206
5	20	(-1)	16,5	(0)	20	(-1)	90,8	18,17	0,237
6	80	(1)	16,5	(0)	20	(-1)	40	31,82	0,414
7	20	(-1)	16,5	(0)	100	(1)	93,8	18,76	0,0489
8	80	(1)	16,5	(0)	100	(1)	91,6	73,26	0,191
9	50	(0)	3	(-1)	20	(-1)	66,5	33,26	0,433
10	50	(0)	30	(1)	20	(-1)	47,3	23,66	0,308
11	50	(0)	3	(-1)	100	(1)	73,7	36,87	0,096
12	50	(0)	30	(1)	100	(1)	91,1	45,55	0,119
13*	50	(0)	16,5	(0)	60	(0)	89,8	44,92	0,195
14*	50	(0)	16,5	(0)	60	(0)	87,1	43,50	0,189
15*	50	(0)	16,5	(0)	60	(0)	90,0	45,00	0,195
16*	50	(0)	16,5	(0)	60	(0)	85,1	42,55	0,184
17*	50	(0)	16,5	(0)	60	(0)	91,0	45,50	0,197

\* centralna tačka

#### 4.4.3 Uticaj reakcionih parametara na stepen konverzije etil-ferulata

Pregledom rezultata prikazanih u tabeli 4.11, vidi se da se dosta razlikuju uslovi pri kojima su izmerene maksimalne i minimalne vrednosti ispitivanih odziva, pa je tako najveći stepen konverzije od 97,8 % ostvaren u eksperimentu 3, koji je izveden pri koncentraciji ferulne kiseline od 20 mmol/dm<sup>3</sup>, molskom odnosu supstrata 30 i masi enzima od 60 mg. S druge strane, najveći prinos od 73,2 mmol/dm<sup>3</sup> ostvaren je u eksperimentu 8, koji je izveden pri koncentraciji ferulne kiseline od 80 mmol/dm<sup>3</sup>, molskom odnosu supstrata 16,5 i masi enzima od 100 mg. U oba prethodna primera se pokazalo da su maksimalne vrednosti odziva dobijene u eksperimentima u kojima su korišćene veće mase enzima. Kako sa porastom količine enzima u reakcionoj smeši rastu i troškovi procesa neophodno je ispitati efikasnost iskorišćenja enzima, što je u ovom radu izvedeno praćenjem specifične enzimске aktivnosti (IU/g). Maksimalna vrednost ovog odziva izmerena je u eksperimentu broj 9, koji je izveden sa 50 mmol/dm<sup>3</sup> ferulnom kiselinom, pri molskom odnosu 3 i masi enzima od 20 mg.

Adekvatnost regresionih modela i signifikantnost dobijenih parametara modela ocenjene su pomoću ANOVA testa i ustanovljeno je da je svaki od modela adekvatan. Nakon statističke analize ustanovljeno je da su kod modela za stepen konverzije signifikantni koeficijenti regresije:  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{23}$ ,  $\beta_{22}$  i  $\beta_{33}$  odnosno dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$y_1(\%) = 87,25 - 15,50x_1 + 2,59x_2 + 13,22x_3 + 12,20x_1x_3 + 9,14x_2x_3 - 12,62x_2^2 - 6,61x_3^2 \quad (4.23)$$

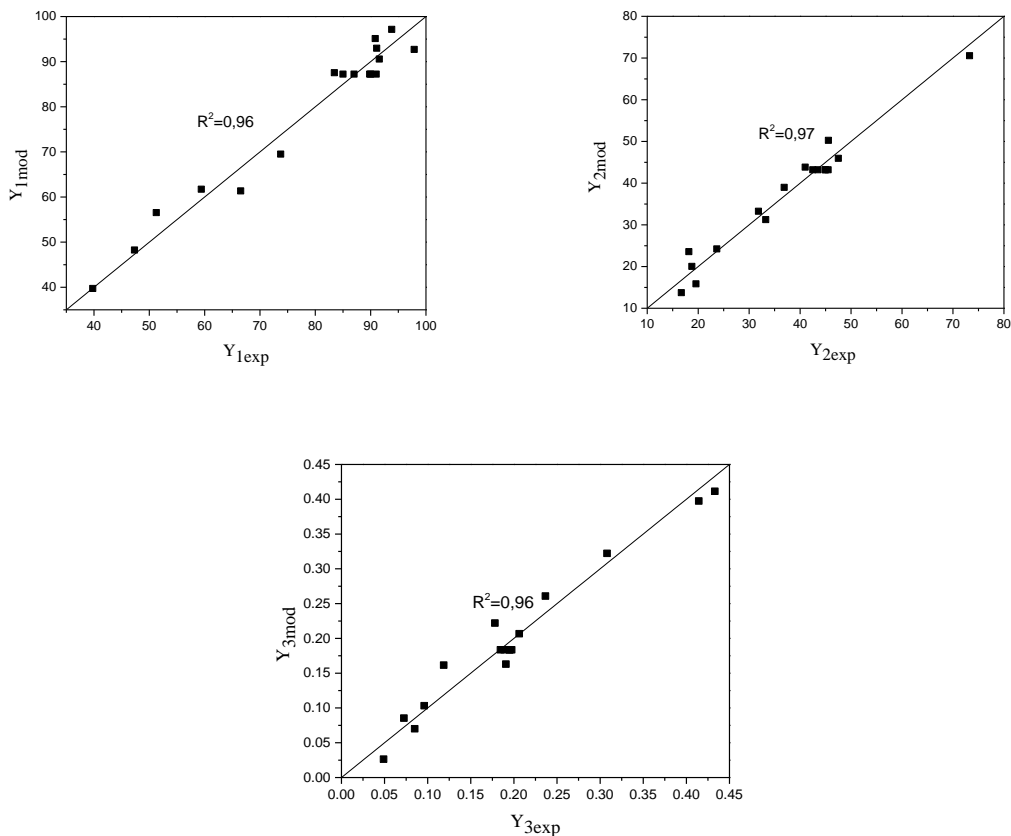
Slično, kod modela za prinos proizvoda se pokazalo da su signifikantni isti koeficijenti regresije i dobijen je sledeći model:

$$y_2(\text{mmol/dm}^3) = 43,20 + 15,05x_1 + 1,06x_2 + 8,44x_3 + 10,21x_1x_3 + 4,57x_2x_3 - 6,35x_1^2 - 7,01x_2^2 \quad (4.24)$$

U slučaju specifične aktivnosti se nakon odbacivanja nesignifikantnih parametara dobija sledeći regresioni model:

$$y_3(\text{IU/g}) = 0,18 + 0,068x_1 - 7,70 \cdot 10^{-3}x_2 - 0,12x_3 + 0,037x_2x_3 - 0,038x_1^2 + 0,066x_3^2 \quad (4.25)$$

Slaganje dobijenih regresionog modela sa eksperimentalnim rezultatima je ilustrovano na slici 4.43.

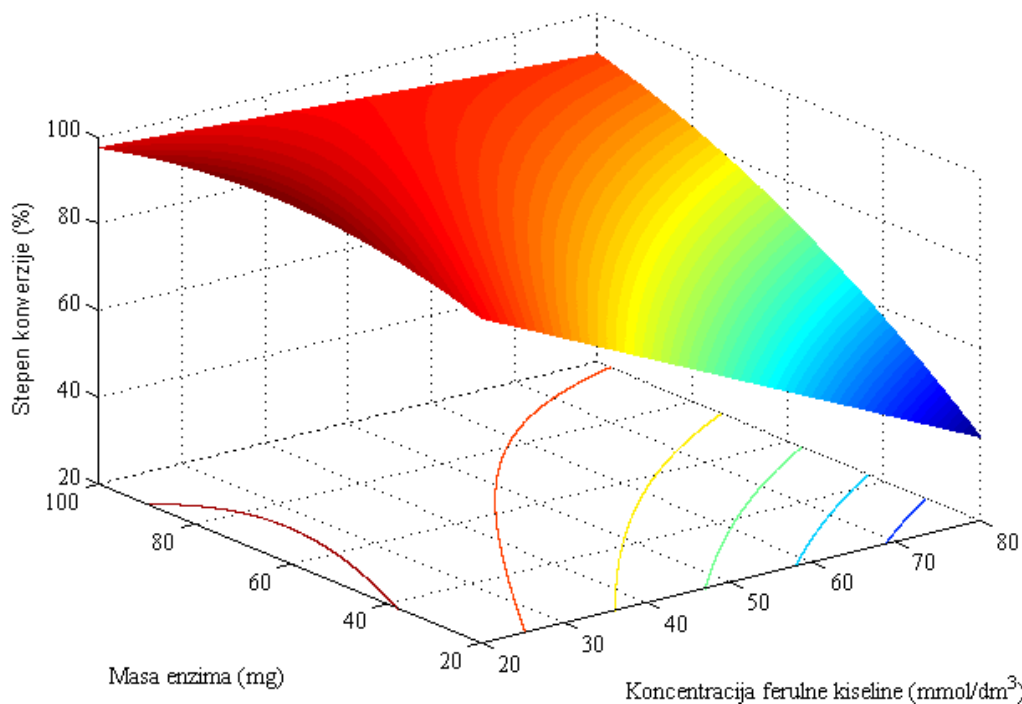


Slika 4.43. Grafički prikaz odstupanja regresionog modela od eksperimentalnih vrednosti.

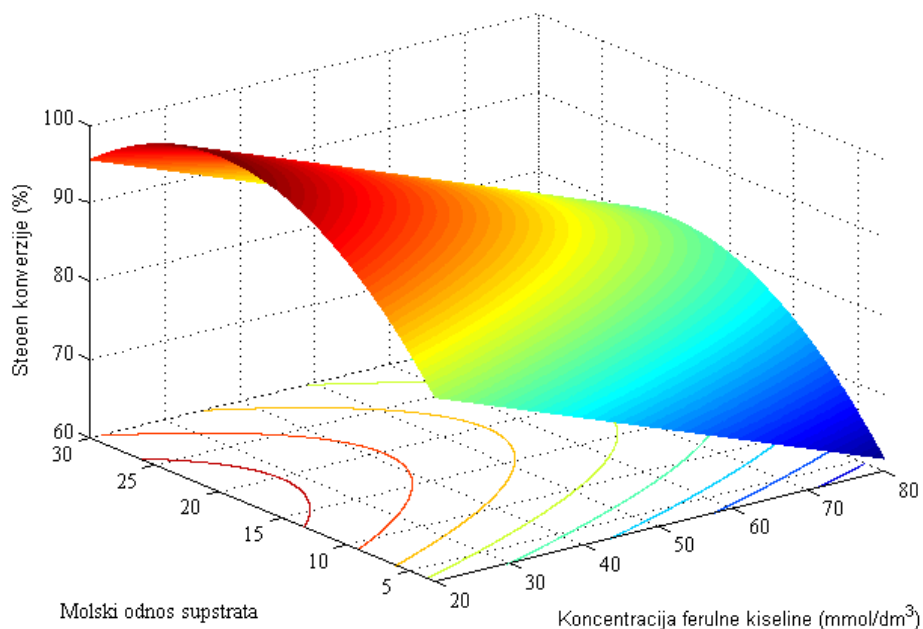
#### 4.4.3.1 Uticaj koncentracije ferulne kiseline

Uticaj koncentracije ferulne kiseline na stepen konverzije definisan je sa dve ključne karakteristike: negativnim linearnim regresionim koeficijentom i pozitivnim koeficijentom interakcije sa masom enzima. Na slici 4.44 se može uočiti da sa porastom koncentracije ferulne kiseline dolazi do konstantnog linearnog pada stepena konverzije, što je posledica negativnog linearnog regresionog koeficijenta. Na istoj slici uočava se veliki pad u stepenu konverzije pri malim masama enzima, dok je pri velikim masama enzima ovaj efekat ublažen, usled postojanja pozitivne interakcije ova dva faktora. Generalno se može zaključiti da se veći stepeni konverzije postižu pri manjim koncentracijama ferulne kiseline, što je potpuno očekivano. Interakcija koncentracije ferulne kiseline i mase enzima je takođe potpuno logična, naime sa više enzima u reakcionoj smeši obezbeđuje se više aktivnih centara za stvaranje acil-enzim kompleksa

a samim tim i proizvoda reakcije. Sličan trend uočen je i u sintezi oleil-cinamata kao što je već diskutovano u prethodnom delu ove disertacije (poglavlje: 4.2.7). Kao optimalna se pokazala koncentracija od 27 mmol/dm<sup>3</sup>, što se jasno vidi na slikama 4.44 i 4.45.



Slika 4.44. Odzivne površine uticaja koncentracije ferulne kiseline i mase enzima na stepen konverzije (molski odnos supstrata  $n(\text{alk.}):n(\text{kis.})=16,5$ ).

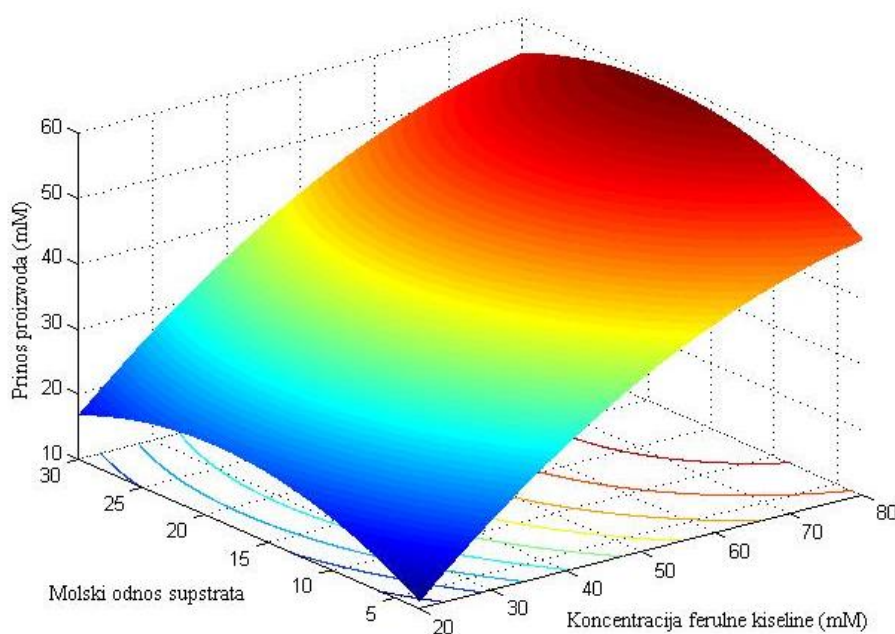


Slika 4.45. Odzivne površine uticaja koncentracije ferulne kiseline i molskog odnosa supstrata na stepen konverzije (masa enzima 75 mg).



S druge strane, kod modela za prinos proizvoda, koncentracija ferulne kiseline ima pozitivan linearni član i negativan koeficijent uz kvadratni član pa se uticaj ovog faktora može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Razlika u odnosu na regresioni model koji opisuje zavisnost stepena konverzije od reakcionih parametara je u pomeranju optimuma koncentracije ferulne kiseline, koji je sada na maksimalnoj ispitanoj vrednosti od 80 mmol/dm<sup>3</sup>, kako što je ilustrovano na slikama 4.46 i 4.48. Usled postojanja pozitivne interakcije sa masom enzima ovaj optimum se pomera ka nižim vrednostima sa smanjenjem mase enzima, slično kao i kod prethodnog modela.

Slično, kod modela za specifičnu aktivnost, maksimalne vrednosti odziva se dobijaju sa velikim koncentracijama kiseline (Slika 4.49), pa je i u ovom slučaju optimalna koncentracija od 80 mmol/dm<sup>3</sup>.

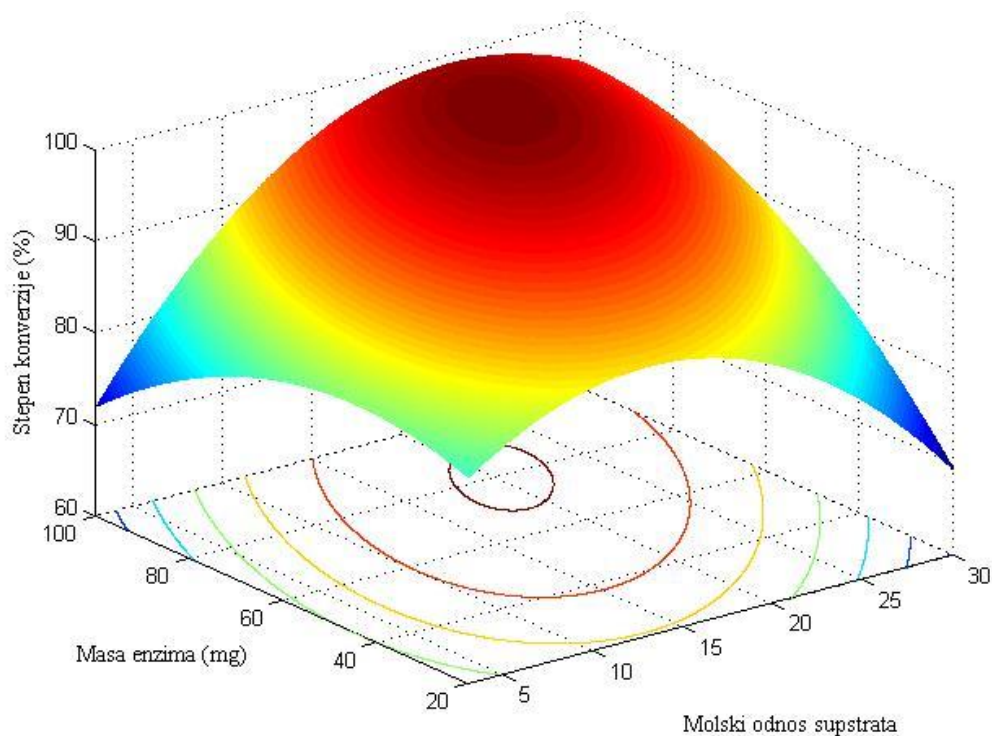


*Slika 4.46. Odzivne površine uticaja koncentracije ferulne kiseline i molskog odnosa supstrata na prinos proizvoda (masa enzima 75 mg).*

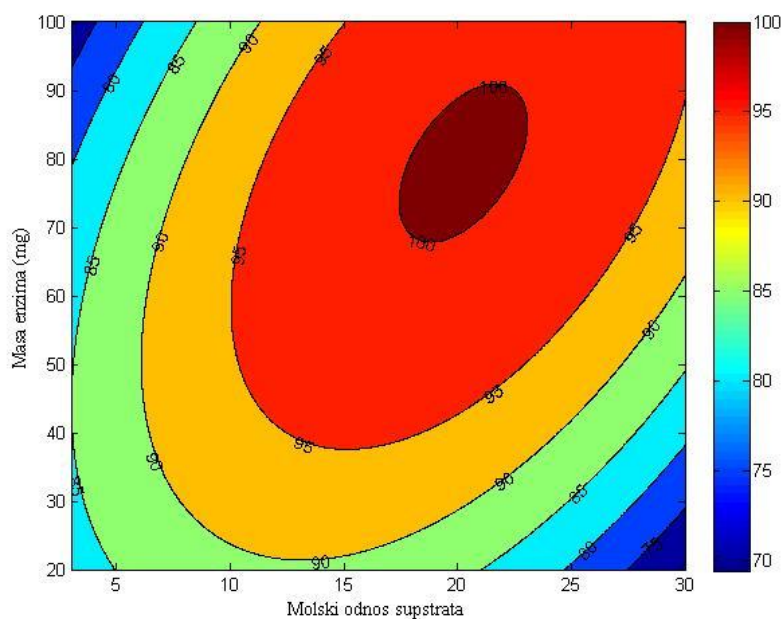
#### **4.4.3.2 Uticaj molskog odnosa**

Uticaj molskog odnosa na stepen konverzije etil-ferulata je nešto složeniji u odnosu na koncentraciju ferulne kiseline, s obzirom da ga pored linearnog regresionog koeficijenta i koeficijenta interakcije sa masom enzima definiše i kvadratni koeficijent regresije. Usled negativne vrednosti ovog koeficijenta zavisnost stepena konverzije od molskog odnosa se može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Na slici 4.47

koja prikazuje zavisnost stepena konverzije od mase enzima i molskog odnosa supstrata jasno se može uočiti da je optimalni molski odnos supstrata ( $n(\text{alk.}):n(\text{kis.})=20$ ), pri čemu se postižu konverzije od blizu 100%. Takođe usled postojanja pozitivne interakcije između ova dva parametra može se uočiti da dolazi do pomeranja optimuma molskog odnosa supstrata, koji se sa smanjenjem mase enzima pomera ka nižim vrednostima. Objašnjenje za interakciju molskog odnosa i mase enzima se treba tražiti u uticaju etanola na aktivnost enzima. Naime, etanol kao polarni supstrat u velikim koncentracijama može da dovede do deaktivacije enzima usled narušavanje mikrovodenog sloja oko enzima koji je neophodan za očuvanje aktivnosti lipaze, što potvrđuju literaturni podaci [76]. Ovaj efekat je najviše izražen pri malim masama enzima i velikim molskim odnosima supstrata kao što se vidi na slici 4.47. S druge strane, ferulna kiselina se loše rastvara u izooktanu, pa je određeni višak etanola u reakcionoj smeši pogodan, jer dovodi do rastvaranja ferulne kiseline čime se povećava njena koncentracija u mikrookolini enzima.



a)



b)

Slika 4.47. a) Odzivne površine uticaja molskog odnosa i mase enzima na stepen konverzije (koncentracija ferulne kiseline 27 mmol/dm<sup>3</sup>). b) Projekcija ove površine.

Uticaj molskog odnosa na prinos etil-ferulata je sličan kao na stepen konverzije i optimum ostaje nepromenjen na  $(n(\text{alk.}):n(\text{kis.}))=20$  (slika 4.46).

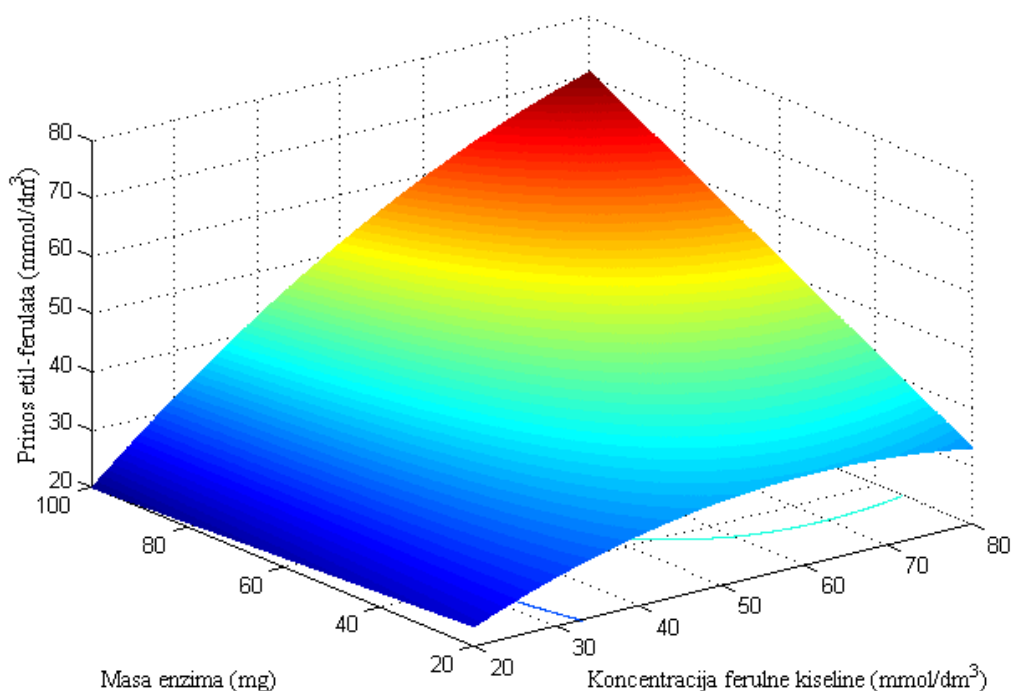
Interesantno je da je linerani koeficijent uz molski odnos u modelu za specifičnu aktivnost ima negativnu vrednost pa sa porastom molskog odnosa supstrata opada specifična aktivnost enzima kao što se vidi na slici 4.50. Međutim pri velikim masama enzima ovaj negativan efekat ne dolazi do izražaja usled postojanja pozitivne interakcije sa masom enzima. Razlog ovakvog ponašanja je pomenuta denaturacija enzima viškom etanola, koja je naravno više izražena pri manjim masama enzima. Kako se maksimalne specifične aktivnosti enzima postižu sa malim masama enzima, vrednost optimalnog molskog odnosa je manja u odnosu na prethodne modele i iznosi 3.

#### 4.4.3.3 Uticaj mase enzima

Slično kao i uticaj molskog odnosa, uticaj mase enzima na stepen konverzije etil-ferulata definisan je kvadratnom funkcijom sa maksimumom, što se vidi na slikama 4.44 i 4.47. Na slici 4.44 se jasno uočava da dolazi do pomeranja optimuma mase enzima usled postojanja pozitivne interakcije sa koncentracijom ferulne kiseline. Naime, pri malim koncentracijama ferulne kiseline, optimalna masa enzima je 75 mg (25 mg/ml) i dalje

povećanje mase enzima dovodi do blagog pada ostvarenog stepena konverzije. Negativni efekat daljeg povećanja mase enzima može biti posledica lošeg prenosa mase usled loše disperzije čestica enzima u reakcionoj smeši. Do sličnih zaključaka došli su u Čen i saradnici prilikom sinteze oleil-ferulata [122]. S povećanjem koncentracije ferulne kiseline optimum mase enzima se pomera ka većim vrednostima i za najveću ispitanu koncentraciju kiseline se nalazi van opsega. Očekivano, najniži stepeni konverzije postignuti su u eksperimentima sa najmanjom masom enzima i najvećom koncentracijom ferulne kiseline.

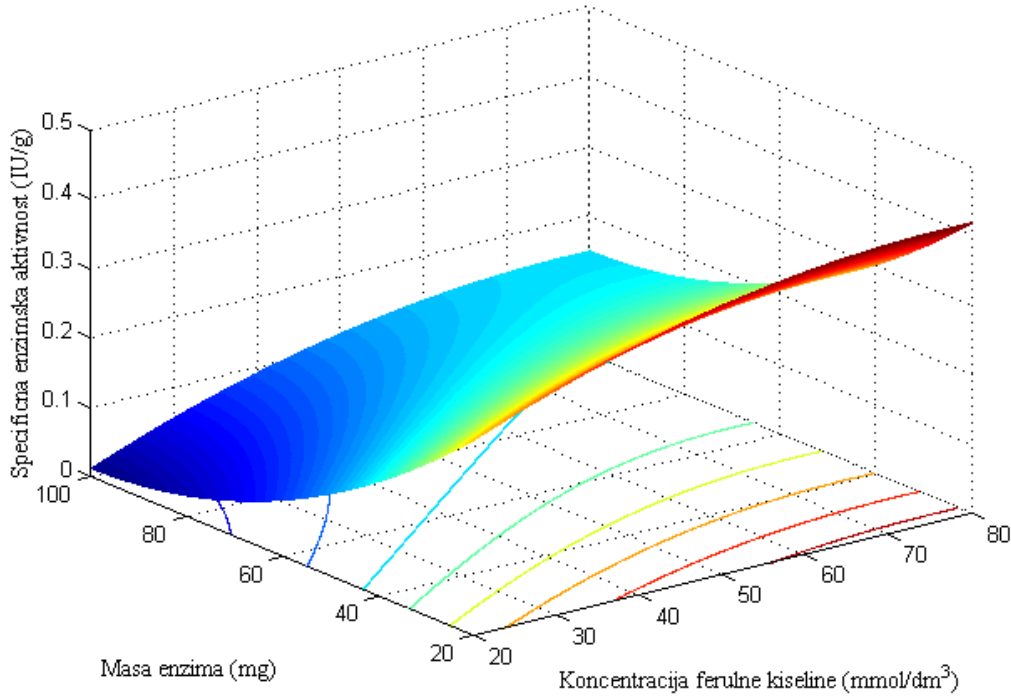
Uticaj mase enzima na prinos proizvoda definisan je pozitivnim koeficijentom uz linearni član, kao i pozitivnom interakcijom sa koncentracijom ferulne kiseline. Pri većim koncentracijama kiseline prinos estra raste sa porastom mase enzima, pa se maksimalni prinosi postižu pri velikim vrednostima mase enzima, odnosno optimalna je najveća ispitanu masa enzima od 100 mg (33,3 mg/ml).



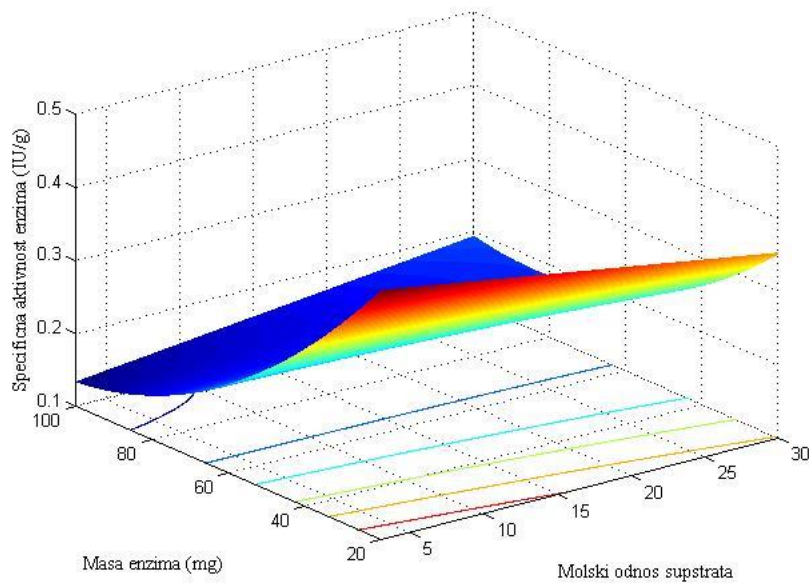
Slika 4.48. Odzivne površine uticaja koncentracije ferulne kiseline i mase enzima na prinos etil-ferulata (molski odnos supstrata  $n(alk.):n(kis.)=20$ ).

Analizom regresione jednačine 4.25 se može zaključiti da je masa enzima faktor sa najizraženijim uticajem na specifičnu enzimsku aktivnost. Uticaj ovog faktora ima tri ključne karakteristike: negativan linearni regresioni koeficijent, pozitivan koeficijent uz kvadratni član i slično kao i u prethodnim modelima pozitivan koeficijent interakcije sa

molskim odnosom. Na slici 4.49 se vidi da sa porastom mase enzima vrednost odziva opada u celom opsegu ispitanih koncentracija ferulne kiseline. Optimalna vrednost mase enzima u ovom slučaju je minimalna ispitana masa enzima od 20 mg.



Slika 4.49. Odzivne površine uticaja koncentracije ferulne kiseline i mase enzima na specifičnu aktivnost (molski odnos supstrata  $n(\text{alk.}):n(\text{kis.})=10$ ).



Slika 4.50. Odzivne površine uticaja molskog odnosa i mase enzima na specifičnu aktivnost (koncentracija ferulne kiseline  $80 \text{ mmol/dm}^3$ ).

## **4.5 Imobilizacija lipaze B iz *C.antarctica* na metakaolin i primena dobijenih imobilizata u sintezi estara fenolnih kiselina**

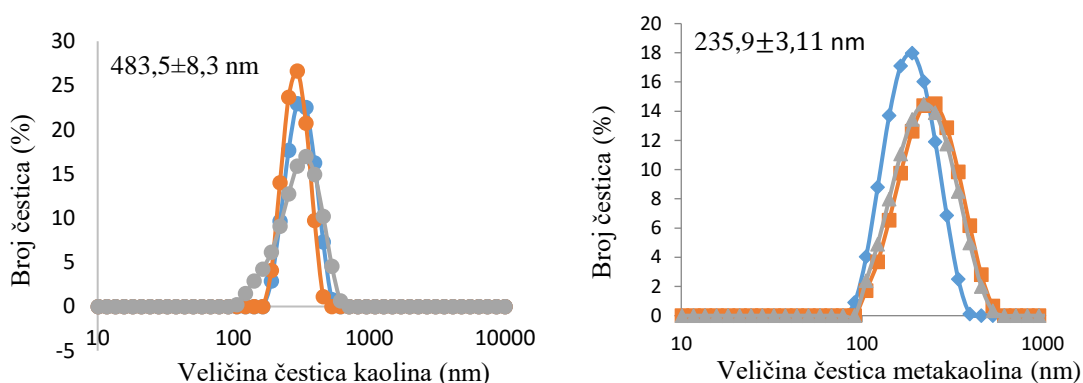
Kao što je već napomenuto, komercijalni imobilisani preparat Novozyme 435 je jako skup, pa se neretko u sintezama katalizovanim ovim enzimom pribegava traženju alternativnih rešenja kako bi se smanjili troškovi procesa. Jedan od načina da se smanje ukupni troškovi sinteze fenolnih estara je da se umesto Novozyme 435 koriste sopstveni imobilisani preparati CALB. U literaturi postoji nekoliko istraživanja u kojima su fenolni estri uspešno sintetisani pomoću imobilizata.

Zbog svoje velike mehaničke čvrstoće, rezistencije na mikroorganizme i velike termičke stabilnosti, glineni minerali, uključujući i kaolin, su veoma interesantni nosači za imobilizaciju enzima. Takođe, pristupačna cena i velika dostupnost ovih minerala doprinose njihovoj atraktivnosti u ovoj oblasti. Imajući to u vidu u nastavku disertacije je izvedena imobilizacija lipaze B (Novozyme L) na kaolin i dobijeni imobilizati su isprobani u reakcijama sinteze fenolnih estara. Kako adsorpcija enzima na glinene minerale zavisi pre svega od fizičkih i hemijskih karakteristika glinenih minerala i enzima, kao i spoljašnjih uticaja poput jonske jačine i pH rastvora [148], u nastavku je izvršena detaljna karakterizacija kaolina, kao i optimizacija uslova imobilizacije uključujući pH rastvora lipaze i jonsku jačinu rastvora lipaze, koncentraciju enzima i vreme imobilizacije.

### **4.5.1 Karakterizacija nosača za imobilizaciju i biokatalizatora**

Pre imobilizacije lipaze B na kaolin izvršena je priprema nosača koja je započeta zagrevanjem hidratisanih čestica kaolina na 550°C. Diferencijalnom termičkom analizom, utvrđeno je da zagrevanje kaolina ima tri izražena efekta, gde se prva fazna transformacija, dehidratacija, dešava u širokom opsegu temperatura, 450-580°C, pri čemu kaolin gubi hidroksilne grupe i prelazi u amorfni aluminosilikat metakaolin [207]. U ovom procesu dolazi do delimičnog razaranja originalne lamele kaolina, što za posledicu ima malo smanjenje u prosečnoj veličini čestica [207]. Ovaj fenomen je potvrđen

merenjem srednje veličine čestica kaolina pomoću cetasažera (Zetasizer Nano ZS) i rezultati su prikazani na slici 4.51. Naime, prosečna veličina čestice kaolina pre zagrevanja iznosila je  $483,5 \pm 8,3$  nm (PDI  $0,583 \pm 0,068$ ) dok je nakon zagrevanja prosečna veličina čestice bila  $235,9 \pm 3,11$  nm (PDI  $0,356 \pm 0,08$ ). Specifična površina čestica kaolina određena pomoću BET adsorpcione izoterme iznosila je  $10,4$  m<sup>2</sup>/g i ostala je gotovo nepromenjena i nakon fazne transformacije u metakaolin [208], što je u skladu sa literaturnim podacima [207, 209]. Međutim, ukupna zapremina pora je kod čestica kaolina iznosila  $0,041$  cm<sup>3</sup>/g, dok je nakon fazne transformacije porasla na  $0,054$  cm<sup>3</sup>/g [208].



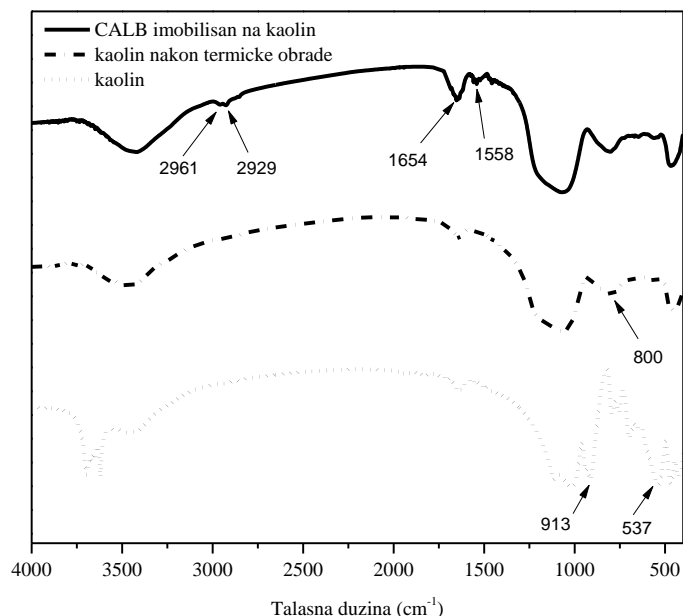
Slika 4.51. Raspodela veličine čestica kaolina i metakaolina.

Tokom procesa dehidratacije kaolina dolazi do smanjenja veličine pora u oblasti mezo- i makropora i do stvaranja dodatnog sekundarnog sistema pora koji čine unutrašnje šupljine čestice [209]. U literaturi je pokazano da je baš nastanak ovog sistema sekundarnih pora doveo do drastične promene u selektivnosti adsorbensa, kada je zadržavanje  $\alpha$ -laktoalbumina poraslo za 56% u odnosu na kaolin koji nije termički tretiran [209]. Kako je molekulska masa ovog proteina 28 kDa, autori smatraju da je ovaj protein dovoljno mali da lako može da pristupi novonastalim mikrometerskim porama i da je upravo to razlog veće retencije ovog proteina na metakaolinu u odnosu na kaolin. S druge strane retencija većeg molekula BSA je bila niža u odnosu na netretirani kaolin [209]. Na osnovu veće ukupne zapremine pora, i činjenice da je molekulska masa CALB (33 kDa) slična molekulskoj masi  $\alpha$ -laktoalbumina, odnosno je da je sekundarni sistem pora dostupan ovom enzimu, imobilizacija CALB je izvedena na termički tretiranom kaolinu. U nastavku je izvršena karakterizacija termički tretiranog kaolina da bi se ustanovilo da li je zaista nastao metakaolin.



#### 4.5.1.1 FT-IR spektri

Na slici 4.52 su prikazani FT-IR spektri kaolina pre zagrevanja, kaolina nakon zagrevanja i imobilisanog enzima.



Slika 4.52. FT-IR spektri nosača i imobilizata.

Transformacija kaolina u metakaolin potvrđena je izgledom FT-IR spektra termički tretiranog kaolina, na kom se može uočiti odsustvo karakteristične Al-O-H trake na 913  $\text{cm}^{-1}$  kao i četiri trake koje su tipične za vibracije -OH grupa [210, 211]. Slabljenje dve apsorpcione trake na 913 i 547  $\text{cm}^{-1}$ , zajedno sa pojavom nove trake na 800  $\text{cm}^{-1}$  pripisano je promeni oktaedarske koordinacije  $\text{Al}^{3+}$  kaolina u tetraedarsku koordinaciju metakaolina [210, 212]. Naime, ova traka se pomera ka većim talasnim dužinama (800  $\text{cm}^{-1}$ ) i dolazi do njenog proširenja pri prelasku kaolina u metakaolin, što je karakteristično za stepen neuređenosti atoma u metakaolinu.

Dobijeni spektar kaolina ima sve karakteristične trake i u skladu sa drugim spektrima kaolina prijavljenim u literaturi [210, 212-214]. Pikovi u oblasti talasnih dužina od 3700 do 3300  $\text{cm}^{-1}$  potiču od vibracija istezanja -OH grupa. Trake na 3696, 3669 i 3652  $\text{cm}^{-1}$  se pripisuju vibracijama istezanja hidroksilnih grupa sa površine, dok je traka na 3619  $\text{cm}^{-1}$  povezana sa unutrašnjim hidroksilnim grupama [213, 215]. Trake na 3468  $\text{cm}^{-1}$  i 1636  $\text{cm}^{-1}$  potiču od vibracija istezanja odnosno savijanja molekula vode. Kao posledica Si-O-Si istezanja u ravni, javljaju se trake na 1114, 1031 i 1007  $\text{cm}^{-1}$  [210, 212]. Dve trake na 938 i 912  $\text{cm}^{-1}$  su pripisane vibracijama unutrašnjih hidroksilnih grupa, dok su

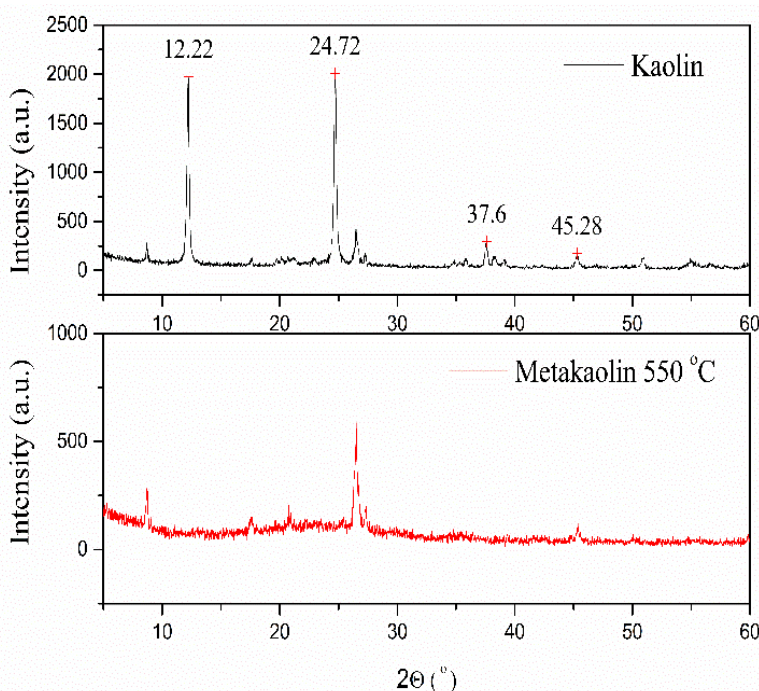


trake na 789, 755 i 698  $\text{cm}^{-1}$  posledica simetričnih vibracija Si-O-Si. Trake zabeležene na najnižim frekvencama 537, 469, 429  $\text{cm}^{-1}$  su karakteristične za oktaedarsku koordinaciju  $\text{Al}^{3+}$  jona [216], kao i Si-O-Si deformacije [210, 212].

Iz FT-IR spektra imobilisanog enzima se jasno vidi da je proces imobilizacije bio uspešan. Naime, trake na 1654 i 1558  $\text{cm}^{-1}$  su posledica  $\text{-C=O}$  valencionih i  $\text{-NH}$  deformacionih vibracija amidne veze. Pozicija ovih traka je nepromenjena u odnosu na slobodan enzim CALB [217], pa se nameće zaključak da nije došlo do interakcija nosača i  $\text{-C=O}$  odnosno  $\text{-NH}$  grupa enzima, odnosno da nisu formirane vodonične veze. Trake na 2961 i 2929  $\text{cm}^{-1}$  su povezane sa C-H valencionim vibracijama, a traka na 1448  $\text{cm}^{-1}$  sa C-H deformacionim vibracijama alkil grupa koje potiču od lipaze adsorbovane na nosač.

#### 4.5.1.2 Analiza difraktograma kaolina i termički tretiranog kaolina

Fazna transformacija kaolina u metakaolin, potvrđena je i difrakcijom X-zracima i dobijeni difraktogrami su prikazani na slici 4.53.



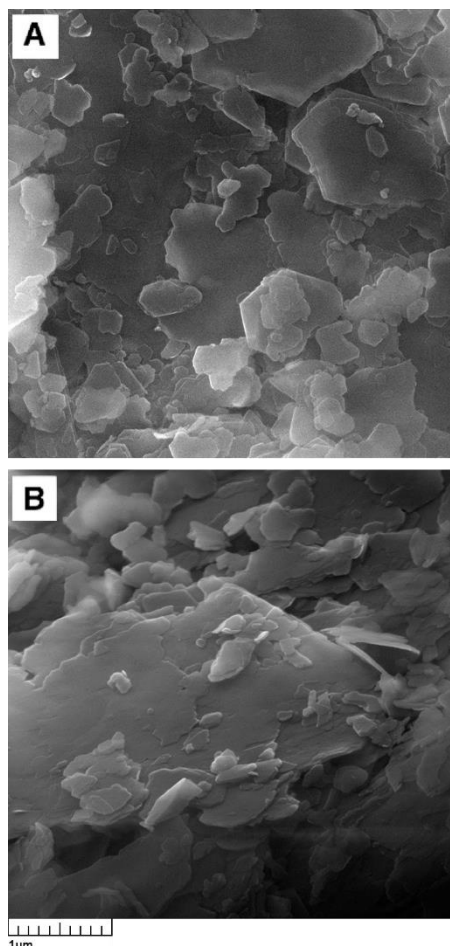
Slika 4.53. Difraktogrami kaolina i metakaolina.

Poređenjem difraktograma za kaolin i metakaolin, koji je zagrevan na 550°C, evidentno je da difrakcioni maksimum duž osnovnog kristalografskog pravca [0 0 1] nestaje kao direktna posledica dehidroksilacije kaolina. Kalicinacija kaolina na

temperaturi iznad 500°C dovodi do neuređenosti u regularnom ređanju slojeva pri čemu oktaedralni raspored prolazi kroz brojne transformacije. Kako napreduje dehidroksilacija, tako se veze između slojeva više raskidaju i narušava se struktura heksagonalne simetrije jedinične kristalne ćelije, tako da se menja koordinacioni broj aluminijuma od šest na četiri. Ove promene strukture dovode do još jačeg slabljenja kohezionih sila između slojeva, pa unutrašnji slojevi postaju dostupniji dejstvu kiselina i drugih reagenasa.

#### 4.5.1.3 SEM

SEM mikrografovi kaolina, termički tretiranog kaolina i imobilizata su prikazani na slici 4.54. Lako se uočava da se uzorak kaolina sastoji od laminarnih agregata čestica, dok je za uzorak metakaolina karakteristična manje homogena mikroskopska topografija koja je posledica procesa dehidratacije.



Slika 4.54. SEM mikrografovi: (A) kaolin; (B) metakaolin

## 4.5.2 Imobilizacija CALB na metakaolin

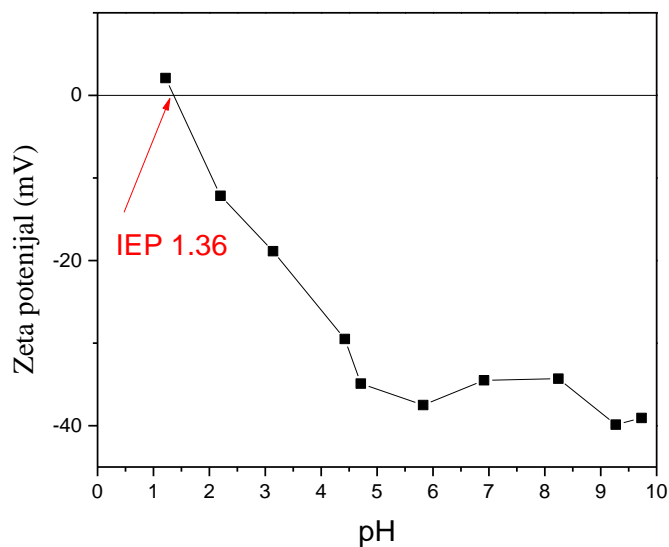
Kako je izvršena detaljna karakterizacija primenjenog nosača, u nastavku se pristupilo optimizaciji procesa imobilizacije CALB na metakaolin. Obim adsorpcije enzima na nosač zavisi od više faktora koji pre svega uključuju osobine površine nosača, pH i jonsku jačinu rastvora za imobilizaciju, kao i strukturu i stabilnost enzima koji se imobilizuje [209, 218]. Prilikom optimizacije procesa adsorpcije enzima na metakaolin, akcent se stavlja na pronalaženje optimalne jonske jačine i pH rastvora za imobilizaciju, jer se očekuje da su elektrostatičke interakcije glavna pokretačka snaga adsorpcije proteina na metakaolin. Naime, slično kao kod kaolina mesta vezivanja proteina za metakaolin su na bazalnim i ivičnim površinama adsorbenta zbog slojevite strukture koja nije podložna interkalaciji, odnosno umetanju „gostujućih” molekula [148]. Na osnovu dobijenih FT-IR spektara, uočeno je da nije došlo do formiranja vodoničnih veza između enzima i nosača, odnosno da molekuli lipaze nisu ugrađeni između unutrašnjih slojeva metakaolina, već da se adsorpcija odigrala na spoljašnjoj površini i ivicama metakaolina [219]. Kako bi se dalje rasvetlio mehanizam adsorpcije CALB na metakaolin, imobilizacija enzima je izvedena pri različitim jonskim jačinama i pH vrednostima. Pored elektrostatičkih interakcija, adsorpcija čestica na metakaolin može da bude posledica i van der Waals-ovih sila, kao i hidrofobnih interakcija [148].

### 4.5.2.1 Uticaj pH na adsorpciju CALB na metakaolin

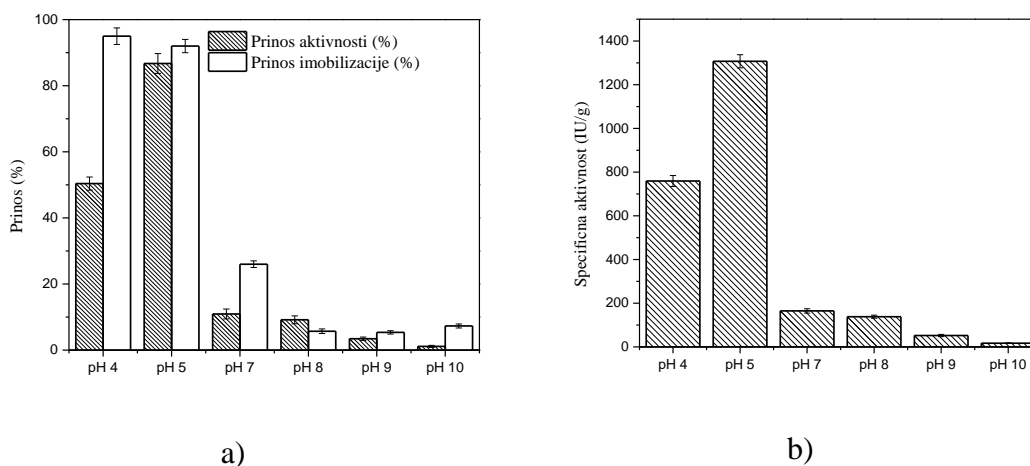
Uticaj pH vrednosti na prinos imobilizacije i prinos aktivnosti ispitan je u opsegu pH 4-10 rastvaranjem CALB u odgovarajućim 10 mmol/dm<sup>3</sup> puferima i to natrijum-acetatnom za pH 4-5, fosfatnom za pH 7-8 i glicerol Na-OH za pH 9-10. Kako bi se potpuno rasvetlile interakcije između enzima i nosača izmeren je zeta potencijal čestica metakaolina pri različitim pH vrednostima i rezultati su prikazani na slici 4.55.

Kao što je ilustrovano na slici 4.55 izoelektrična tačka (IEP) metakaolina je na pH 1,36. Slične vrednosti IEP kaolina mogu da se nađu u literaturi [220, 221]. Dobijena vrednost IEP ukazuje da sloj aluminijuma nije doprineo površinskom naelektrisanju metakaolina, pošto je dobijena vrednost slična IEP vrednosti čiste silike [222]. Prema ovoj vrednosti, ukupno naelektrisanje nosača će biti negativno za sve vrednosti iznad 1,36. S druge strane, izoelektrična tačka enzima je na pH 6,8 [55], pa će za manje

vrednosti pH enzim biti pozitivno naelektrisan, a za veće pH vrednosti enzim je negativno naelektrisan. Uticaj pH na prinos aktivnosti i imobilizacije prikazan je na slici 4.56.



Slika 4.55. Zavisnost zeta potencijala metakaolina od pH.



Slika 4.56. Uticaj pH na: a) prinos imobilizacije i prinos aktivnosti; b) aktivnost imobilizata.

Kao što se vidi na slici 4.56a, procenat adsorbovane lipaze opada sa porastom pH od 4 do 10. Takvo ponašanje je očekivano s obzirom na vrednosti IEP enzima i metakaolina, s obzirom da je jonska adsorpcija favorizovana kada su enzim i metakaolin suprotno naelektrisani. S druge strane, s porastom pH preko 7 dolazi do drastičnog pada prinosa imobilizacije usled elektrostatičkog odbijanja enzima i nosača. Međutim, i pri ovim uslovima deo enzima biva adsorbovan na metakaolin, jer čestice metakaolina imaju tipičan model heterogene raspodele naelektrisanja (patch-wise) na površini, pa je i pri ovim uslovima moguća adsorpcija negativno naelektrisanog enzima na bazalne ravni i

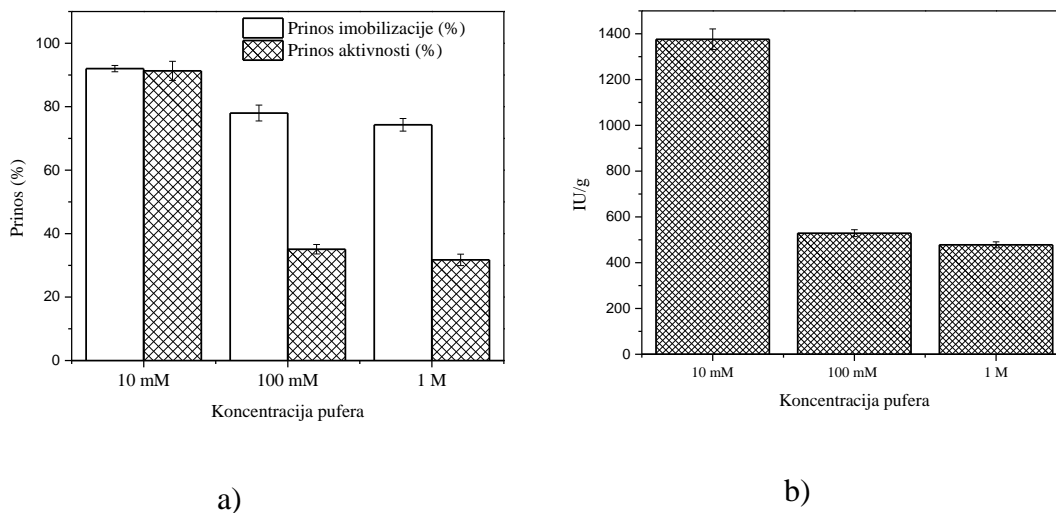
ivične površine [223]. Takođe, i proteini mogu da imaju pozitivno naelektrisane delove i iznad IEP, čime je omogućena adsorpcija enzima na negativno naelektrisanu površinu metakaolina i u oblastima pH iznad IEP [224]. Dodatno, van der Valsove i hidrofobne interakcije mogu da budu pogonske sile za adsorpciju enzima na mineralne nosače [224, 225]. Slični rezultati dobijeni su prilikom adsorpcije CALB na zelena kokosova vlakna, gde je količina vezanih proteina pratila isti trend kao u ovoj disertaciji, sa maksimumom na pH 4 i 5 [226].

Sa slike 4.56a se vidi da se prinos aktivnosti dobro slaže sa prinosom imobilizacije, sa izuzetkom na pH 4 na kom je adsorbovana najveća količina lipaze a aktivnost imobilizata je niža od aktivnosti dobijene adsorpcijom lipaze na pH 5. Razlog može da bude nepovoljna orijentacija enzima na pH 4, zbog toga što više naelektrisanih grupa postaje izloženo na površini enzima pa je moguće uspostavljanje dodatnih interakcija između enzima i nosača. Dodatno, nekoliko autora je ovakvo ponašanja objasnilo fenomenom poznatim kao A stanje ili "molten globule", u kom tercijarna struktura enzima postaje više fleksibilna, što dovodi do gubitka katalitičke aktivnosti, koji je još izraženiji prilikom interakcija pozitivno naelektrisanog enzima sa negativno naelektrisanim nosačem [227].

#### **4.5.2.2 Uticaj jonske jačine na adsorpciju CALB na metakaolin**

Koncentracija pufera u kom se rastvara enzim ima veliki uticaj na prirodu i jačinu interakcija između enzima i nosača. Naime, pri velikim jonskim jačinama favorizuju se hidrofobne interakcije, jer dolazi do izlaganja hidrofobnih zona enzima [228]. Ovaj fenomen je pripisan dehidrataciji proteina prouzrokovanoj efektom hidratacije molekula soli koji okružuju protein [229]. S druge strane, elektrostatičke interakcije su smanjene u prisustvu soli jer se ponašaju kao kompetitivni izmenjivači jona. Kao zaključak može da se izvede da ukoliko se imobilizacija enzima na nosač odvija samo putem elektrostatičkih interakcija s povećanjem jonske jačine može da se očekuje oštar pad u prinosu imobilizacije. Kao što se vidi na slici 4.57, s porastom jonske jačine došlo je do blagog pada prinosa imobilizacije, što ukazuje na kompleksnost interakcija između enzima i metakaolina, odnosno da je imobilizacija CALB na metakaolin posledica kombinovanog efekta elektrostatičkih, van der Valsovih i hidrofobnih interakcija [148, 227, 230]. S druge strane, došlo je do naglog pada prinosa aktivnosti i aktivnosti imobilizata. Ovakvi

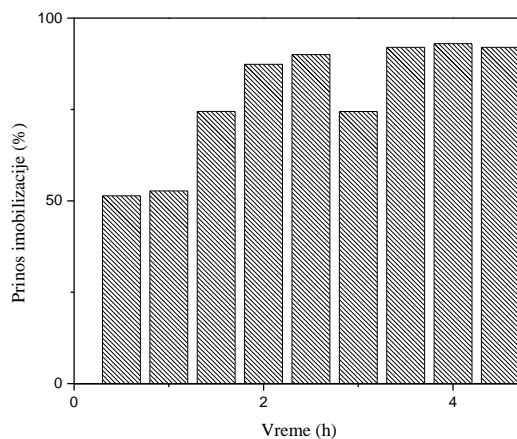
rezultati ukazuju na nepovoljnu orijentaciju enzima tokom imobilizacije kada su pored elektrostatičkih interakcija i druge interakcije pogonska sila adsorpcija. Tako da je za dalji rad izabrana najmanja jonska jačina pufera.



Slika 4.57. Uticaj jonske jačine na: a) prinos imobilizacije i prinos aktivnosti; b) specifična aktivnost imobilizata.

#### 4.5.2.3 Kinetika adsorpcije CALB na metakaolin

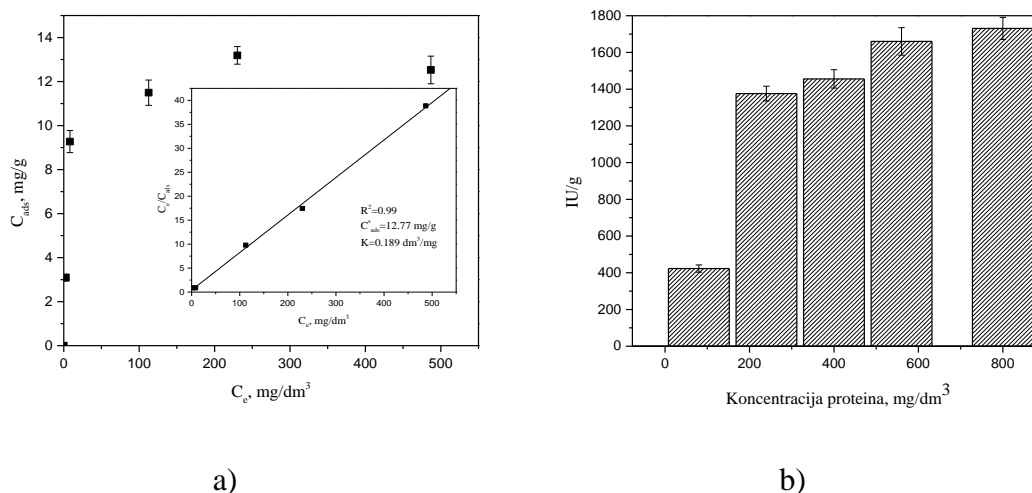
Adsorpcija CALB na metakaolin je brz proces, gde se maksimum adsorpcije dostiže već nakon 4 h (slika 4.58). Dalje povećanje vremena imobilizacije nije dovelo do značajnih promena u prinosu imobilizacije. Slični rezultati postignuti su prilikom adsorpcije insekticidalnog proteina iz *B. thuringiensis* [231], kao i  $\beta$ -laktoglobulina,  $\alpha$ -laktolabumina i BSA na kaolin [219]. Ovakva kinetika vezivanja enzima za nosač je veoma bitna sa ekonomske tačke gledišta.



Slika 4.58. Kinetika adsorpcije CALB na metakaolin.

#### 4.5.2.4 Adsorpciona izoterma

Uticaj koncentracije enzima na prinos imobilizacije i prinos aktivnosti ispitan je u 10 mmol/dm<sup>3</sup> acetatnom puferu pH 5, koji se pokazao kao optimalan u prethodnim eksperimentima variranjem koncentracije enzima od 0,08-0,8 mg/cm<sup>3</sup>, odnosno 12,5-125 IU/cm<sup>3</sup>.



Slika 4.59. Uticaj koncentracije proteina na: a) vezane proteine po masi nosača; b) aktivnost imobilizata.

Na slici 4.59 je prikazana zavisnost vezanih proteina po masi nosača od koncentracije proteina. Ovaj eksperiment je izveden s ciljem utvrđivanja maksimalnog kapaciteta adsorpcije metakaolina za CALB. Takođe, svakom od dobijenih imobilizata je određena aktivnost kao što je prikazano na slici 4.59. Adsorpciona izoterma (Slika 4.59) ima oblik klasične Lengmirove (Langmuir) izoterme, što je u skladu sa drugim radovima o adsorpciji proteina na glinene materijale [209, 219, 231, 232]. Lengmirova izoterma pretpostavlja postojanje tačke zasićenja posle koje se dostiže plato, odnosno više ne dolazi do adsorpcije/desorpcije. Eksperimentalno rezultati su modelovani jednačinom koja opisuje Lengmirovu adsorpcionu izotermu [232] (jed.(4.26) i pokazalo se je postignuto odlično slaganje ( $R^2=0,99$ ). Dobro slaganje eksperimentalnih podataka i Lengmirovog adsorpcionog modela ukazuje da se adsorpcija nije odigrala u više slojeva, već da se odigrala u monosloju jer je posledica elektrostatičkih interakcija.

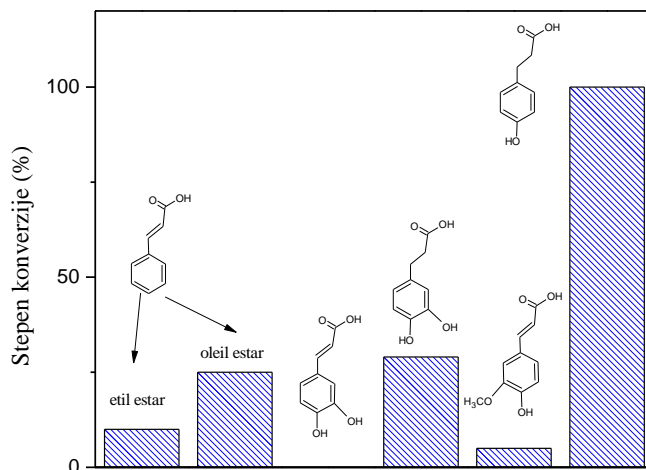
$$\frac{C_e}{C_{ads}} = \frac{1}{C_{ads}^s \cdot K} + \frac{C_e}{C_{ads}^s} \quad (4.26)$$

gde  $C_e$  ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) predstavlja ravnotežnu koncentraciju proteina,  $C_{\text{ads}}$  i  $C_{\text{ads}}^S$  ( $\text{mg}/\text{g}$ ) masu adsorbovanih proteina pri različitim ravnotežnim koncentracijama proteina i masu proteina adsorbovanih prilikom dostizanja platoa, dok je  $K$  ( $\text{dm}^3/\text{mg}$ ) numerički izražen afinitet proteina za metakaolin.

Zavisnost aktivnosti dobijenih imobilizata od koncentracije proteina pokazuje da sa porastom koncentracije enzima raste aktivnost dobijenih imobilizata, međutim stepen povećanja aktivnosti nije proporcionalan povećanju koncentracije proteina. Najveći porast aktivnosti imobilizata,  $\sim 3$  puta, zabeležen je pri porastu koncentracije proteina sa  $80\text{-}250 \text{ mg}/\text{dm}^3$ . Nakon toga dalji porast koncentracije proteina doveo je do blagog porasta aktivnosti, što je u skladu sa dobijenom adsorpcionom izotermom.

#### 4.5.2.5 Sinteza estara fenolnih kiselina sa CALB imobilisanom na metakaolin

Kao što je već pomenuto, ideja ovog dela disertacije je bila da se napravi imobilizat CALB koji bi služio kao zamena za Novozyme 435 u sintezi estara fenolnih kiselina. Isprobana je sinteza svih estara pri uslovima opisanim u metodi 3.1.3.5 sa  $20 \text{ mg}$  enzima i  $72 \text{ h}$  i rezultati su prikazani na slici 4.60.



Slika 4.60. Uticaj acil donora na stepen konverzije sinteze fenolnih estara katalizovane sa CALB imobilisanom na metakaolin.

Kao što se vidi slici 4.60, imobilizacijom CALB na metakaolin se nije promenila specifičnost prema fenolnim kiselinama u odnosu na Novozyme 435. Naime, najveći stepen konverzije dobijen je sa *p*-hidroksipropionskom kiselinom isto kao i sa Novozyme 435. Uvođenje još jedne hidroksilne grupe na prsten dovodi do smanjenja



stepena konverzije i to za gotovo 70%. Velika razlika u dobijenim stepenima konverzije sa ove dve kiseline drugačija je u odnosu na Novozyme 435, pa se može zaključiti da se imobilizacijom na metakaolin uvećao inhibitorni efekat prouzrokovan sternim smetnjama dve hidroksilne grupe na benzenovom prstenu. Potvrda ovog rezultata vidi se i iz stepena konverzije dobijenog sa cimetnom kiselinom, odnosno Novozyme 435 pokazuje veći afinitet prema dihidrokafenoj kiselini u odnosu na dobijeni imobilizat. Slično kao sa Novozyme 435, veći stepen konverzije je dobijen sa oleil alkoholom u odnosu na etanol, pa ovakav rezultat može da ukaže na inaktivaciju dobijenog imobilizata etanolom. Slično kao sa Novozyme 435 niski prinosi dobijeni su u sintezi oleil-kafeata i etil-ferulata.

## 5 Zaključak

- Pokazano je da je komercijalni imobilisani preparat lipaze B iz *C. antarctica* superioran biokatalizator u odnosu na komercijalnu imobilisanu lipazu iz *R. miehei* u svim izvedenim sintezama estara. Prikazano je da obe ispitane lipaze najveći afinitet pokazuju prema fenolnim kiselinama koje imaju zasićen bočni niz, *p*-hidroksifenilpropionskoj i dihidrokafenoj kiselini. Takođe, pokazalo se da lipaza B iz *C. antarctica* pokazuje veći afinitet prema nesupstituisanoj cimetnoj kiselini, nego prema njenim supstituisanim derivatima, *p*-kumarinskoj, *p*-metoksicimetnoj, ferulnoj i kafenoj kiselini. Uočeno je da je ova inhibicija lipaze posledica kombinacije elektronskog i sternog efekta, pri čemu je pokazano da je uloga elektronskog efekta dominantna.
- Prilikom ispitivanja afiniteta lipaze prema različitim acil akceptorima pokazalo se da kada je cimetna kiselina acil donor, broj C atoma alifatičnog alkohola nema značajan uticaj na ostvaren stepen konverzije cimetne kiseline, iako se može zaključiti da sa porastom C atoma opada afinitet lipaze prema alifatičnim alkoholima. Sintaza estara cimetne kiseline i aromatičnih alkohola je u potpunosti izostala. Pokazano je da je antioksidativna aktivnost dobijenih estara cimetne kiseline veća od antioksidativne aktivnosti same kiseline, što je posledica zamene H atoma karboksilne grupe alkil grupom koja induktivno donira elektrone benzenovom prstenu čineći ga reaktivnijim.
- Pokazano je da je Novozyme 435 aktivan uz minimalne količine vode pa je povećanje prinosa i ekonomičnosti postupka omogućeno primenom molekulskih sita za uklanjanje viška vode iz reakcionog sistema. Kao optimalni reakcioni medijum pokazao se nepolarni izooktan, iako je rastvorljivost fenolnih supstrata u ovom reakcionom medijumu neznatna, čime je potvrđen pozitivan efekat nepolarnih rastvarača na aktivnost enzima. Ispitivanje molskog odnosa etanola i cimetne kiseline, pokazalo je da određeni višak etanola pogoduje sintezi etil-cinamata, jer rastvara cimetnu kiselinu i povećava njenu koncentraciju u mikrookolini enzima, dok prevelika količina etanola dovodi do inhibicije enzima, jer odvlači vodu sa površine enzima a koja je esencijalna za njegovu katalitičku aktivnost.
- Optimizacija najznačajnijih reakcionih parametara (temperature, količine enzima, koncentracije limitirajućeg supstrata, reakcionog vremena i molskog odnosa supstrata)

primenom statističkog planiranja eksperimenata i analiza rezultata metodom odzivnih površina sa aspekta tri odabrana odziva (stepen konverzije, prinos estera i specifične esterifikacione aktivnosti) omogućila je povećanje efikasnosti procesa i dala uvid u intenzitet i prirodu interakcija među ispitivanim faktorima. Pored stepena konverzije, uobičajene odzivne veličine u većini naučnih radova vezanih za ovu tematiku, analizirana je i specifična enzimaska aktivnost, odzivna veličina koja daje uvid u ekonomičnost procesa, jer uključuje i količinu enzima kao i reakcione vreme, pa je optimizacijom ovog odziva značajno povećana efikasnost procesa.

- Razvijen je i optimizovan reaktorski sistem sa fluidizovanim slojem koji je uspešno implementiran u sintezi etil-cinamata korišćenoj kao model reakciji sinteze estera fenolnih kiselina. Izvođenjem reakcije u semikontinualnom režimu značajno je povećana efikasnost proizvodnje etil-cinamata, pa je tako nakon 23 h specifični prinos proizvoda u reaktoru sa fluidizovanim slojem bio gotovo 2,5 puta veći u odnosu na šaržni reaktor. Kako bi se omogućilo povećanje razmera procesa, pored razvoja efikasnog reaktorskog sistema određeni su i odgovarajući kinetički modeli sinteze etil-cinamata u oba bioreaktorska sistema. Pokazalo se da se reakcija sinteze etil-cinamata odvija prema ping-pong bi bi mehanizmu, ali u šaržnom reaktoru postoji inhibicije enzima alkoholom u višku. Na osnovu vrednosti ove konstante može se zaključiti da stepen inhibicije nije značajan.
- Hidrodinamički proračun je pokazao da je pod odabranim operativnim uslovima moguće sprečiti uticaj unutrašnjeg i spoljašnjeg otpora prenosu mase na reakcioni tok, odnosno potvrđeno je da je reakcija kinetički kontrolisana, te da je dobijeni kinetički model validan.
- Lipaza B pokazuje veću selektivnost prema alifatičnim alkoholima kada se kao acil donor koristi ferulna kiselina, što je posledica oblika aktivnog centra ovog enzima. Kao najbolji acil akceptor pokazao se najkraći acil akceptor, etanol. Takođe, estri ferulne kiseline pokazuju nešto nižu antioksidativnu aktivnost od same kiseline, što je posledica smanjenja reaktivnosti hidroksilne grupe na benzenovom prstenu zbog eletron-donorskog efekta alkil grupe u bočnom nizu. Za razliku od cimetine kiseline kod koje se inhibicija DPPH radikala odvija po HAT mehanizmu, u slučaju ferulne kiseline se odvija prema

mehanizmu transfera elektrona. Optimizacijom ključnih faktora esterifikacije, značajno je unapređena reakcije sinteze etil-ferulata, pri čemu je dobijen prinos od gotovo 100%.

- Dalje povećanje ekonomičnosti postupka sinteze fenolnih estara omogućeno je razvojem sopstvenog imobilisanog preparata lipaze B. Kao nosač za imobilizaciju korišćen je metakaolin, jeftin i veoma dostupan materijal. U relevantnoj literaturi nema podataka o imobilizaciji ovog enzima na metakaolin, pa rezultati dobijeni u ovoj disertaciji predstavljaju originalan doprinos u ovoj naučnoj oblasti. Pokazano je da je se imobilizacijom lipaze B na metakaolin ne utiče na njenu specifičnost prema fenolnim kiselinama. Pokazano je da se adsorpcija lipaze B na metakaolin odvija prema Lengmirovom modelu i da elektrostatičke interakcije najviše doprinose, ali ne i jedino, vezivanju lipaze za dati neorganski nosač.

## 6 Literatura

1. Leopoldini, M., N. Russo, and M. Toscano, *The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants*. Food Chemistry, 2011. **125**(2): p. 288-306.
2. Foti, M.C., *Antioxidant properties of phenols*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2007. **59**(12): p. 1673-1685.
3. Bezbradica D. *Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom i lipazom imobilisanom na polimerne nosače*. Doktorska disertacija, 2007. Univerzitet u Beogradu.
4. DiCosimo, R., J. McAuliffe, A.J. Poulouse, and G. Bohlmann, *Industrial use of immobilized enzymes*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6437-6474.
5. Pham-Huy, L.A., H. He, and C. Pham-Huy, *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health*. International Journal of Biomedical Science : IJBS, 2008. **4**(2): p. 89-96.
6. Rajendran, P., N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami, E.N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiiah, J. Gopas, and I. Nishigaki, *Antioxidants and human diseases*. Clinica chimica acta, 2014. **436**: p. 332-47.
7. Halliwell, B., *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
8. Genestra, M., *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. Cell Signal, 2007. **19**(9): p. 1807-19.
9. Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(1): p. 44-84.
10. Vlasisavljević, S. *Hemijska, biohemijska i mikrobiološka karakterizacija Trifolium pratense L.* Doktorska disertacija, 2014. Univerzitet u Novom Sadu.
11. Mitić, M. *Kinetika degradacije fenolnih jedinjenja hidrosil radikalima*. Doktorska disertacija, 2011. Univerzitet u Nišu.
12. Halliwell, B., *How to characterize a biological antioxidant*. Free Radical Research Communications, 1990. **9**(1): p. 1-32.
13. Matsuzawa, A. and H. Ichijo, *Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2008. **1780**(11): p. 1325-1336.
14. Radojković, M. *Ekstrakti duda (Morus spp., Moraceae), sastav, delovanje i primena*. Doktorska disertacija, 2012. Univerzitet u Novom Sadu.
15. Artico, M., R. Di Santo, R. Costi, E. Novellino, G. Greco, S. Massa, E. Tramontano, M.E. Marongiu, A. De Montis, and P. La Colla, *Geometrically and Conformationally Restrained Cinnamoyl Compounds as Inhibitors of HIV-1 Integrase: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling*. Journal of Medicinal Chemistry, 1998. **41**(21): p. 3948-3960.
16. Duthie, G. and A. Crozier, *Plant-derived phenolic antioxidants*. Current Opinion in Lipidology, 2000. **11**(1): p. 43-47.

17. Lee, Y.-T., *Structure activity relationship analysis of phenolic acid phenethyl esters on oral and human breast cancers: The grey GM(0, N) approach*. Computers in Biology and Medicine, 2011. **41**(7): p. 506-511.
18. Montpied, P., F. de Bock, G. Rondouin, G. Niel, L. Briant, A.-S. Courseau, M. Lerner-Natoli, and J. Bockaert, *Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures*. Molecular Brain Research, 2003. **115**(2): p. 111-120.
19. Son, S. and B.A. Lewis, *Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure–Activity Relationship*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **50**(3): p. 468-472.
20. Watabe, M., K. Hishikawa, A. Takayanagi, N. Shimizu, and T. Nakaki, *Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NFκB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(7): p. 6017-6026.
21. Robbins, R.J., *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(10): p. 2866-2887.
22. Leopoldini, M., T. Marino, N. Russo, and M. Toscano, *Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism*. The Journal of Physical Chemistry A, 2004. **108**(22): p. 4916-4922.
23. Foti, M.C., C. Daquino, and C. Geraci, *Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions*. The Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(7): p. 2309-2314.
24. Cuvelier, M.-E., H. Richard, and C. Berset, *Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992. **56**(2): p. 324-325.
25. Pokorny, J., L. Trojakova, and M. Takacsova, *15 - The use of natural antioxidants in food products of plant origin*, in *Antioxidants in Food*. 2001, Woodhead Publishing. p. 355-372.
26. Kikuzaki, H., M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, and H. Taniguchi, *Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(7): p. 2161-2168.
27. Chen, J.H. and C.-T. Ho, *Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(7): p. 2374-2378.
28. Natella, F., M. Nardini, M. Di Felice, and C. Scaccini, *Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(4): p. 1453-9.
29. Silva, F.A.M., F. Borges, C. Guimarães, J.L.F.C. Lima, C. Matos, and S. Reis, *Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. **48**(6): p. 2122-2126.
30. Paiva, A.L., V.M. Balcao, and F.X. Malcata, *Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases\**. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**(3-5): p. 187-204.

31. Feddern, V., Z. Yang, X. Xu, E. Badiale-Furlong, and L.A. De Souza-Soares, *Synthesis of octyl dihydrocaffeate and its transesterification with tricaprylin catalyzed by Candida antarctica lipase*. Industrial and Engineering Chemistry Research, 2011. **50**(12): p. 7183-7190.
32. Sun, S., F. Song, Y. Bi, G. Yang, and W. Liu, *Solvent-free enzymatic transesterification of ethyl ferulate and monostearin: optimized by response surface methodology*. Journal of Biotechnology, 2012. **164**(2): p. 340-5.
33. Aziz, S., P. Dutilleul, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed transesterification of krill oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid in solvent-free medium using response surface methodology*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012. **84**: p. 189-197.
34. Bidjou-Haiour, C. and N. Klai, *Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties*. Asian Journal of Chemistry, 2013. **25**(8): p. 4347-4350.
35. Adlercreutz, P., *Immobilisation and application of lipases in organic media*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6406-36.
36. Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra, and M.T. Reetz, *Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases*. Annual Review of Microbiology, 1999. **53**: p. 315-51.
37. Houde, A., A. Kademi, and D. Leblanc, *Lipases and their industrial applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology. **118**(1): p. 155-170.
38. Hasan, F., A.A. Shah, and A. Hameed, *Industrial applications of microbial lipases*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(2): p. 235-251.
39. Borrelli, G. and D. Trono, *Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(9): p. 20774.
40. Seth, S., D. Chakravorty, V.K. Dubey, and S. Patra, *An insight into plant lipase research – challenges encountered*. Protein Expression and Purification, 2014. **95**: p. 13-21.
41. Nagarajan, S., *New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012. **168**(5): p. 1163-1196.
42. Gupta, R., A. Kumari, P. Syal, and Y. Singh, *Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology*. Progress in Lipid Research, 2015. **57**: p. 40-54.
43. Ollis, D.L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag, and et al., *The alpha/beta hydrolase fold*. Protein Engineering, 1992. **5**(3): p. 197-211.
44. Anobom, C.D., A.S. Pinheiro, R.A. De-Andrade, E.C.G. Aguiéiras, G.C. Andrade, M.V. Moura, R.V. Almeida, and D.M. Freire, *From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 11.
45. Kohno, M., J. Funatsu, B. Mikami, W. Kugimiya, T. Matsuo, and Y. Morita, *The crystal structure of lipase II from Rhizopus niveus at 2.2 Å resolution*. Journal of Biochemistry, 1996. **120**(3): p. 505-10.

46. Brady, L., A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Norskov, and et al., *A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase*. *Nature*, 1990. **343**(6260): p. 767-70.
47. van Pouderooyen, G., T. Eggert, K.E. Jaeger, and B.W. Dijkstra, *The crystal structure of Bacillus subtilis lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme*. *Journal of Molecular Biology*, 2001. **309**(1): p. 215-26.
48. Nardini, M. and B.W. Dijkstra, *Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing*. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999. **9**(6): p. 732-7.
49. Neves Petersen, M.T., P. Fojan, and S.B. Petersen, *How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution*. *Journal of Biotechnology*, 2001. **85**(2): p. 115-147.
50. Pleiss, J., M. Fischer, and R.D. Schmid, *Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998. **93**(1-2): p. 67-80.
51. Naik, S., A. Basu, R. Saikia, B. Madan, P. Paul, R. Chatterjee, J. Brask, and A. Svendsen, *Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010. **65**(1-4): p. 18-23.
52. Cherukuvada, S.L., A.S. Seshasayee, K. Raghunathan, S. Anishetty, and G. Pennathur, *Evidence of a double-lid movement in Pseudomonas aeruginosa lipase: insights from molecular dynamics simulations*. *PLoS Computational Biology*, 2005. **1**(3): p. e28.
53. Gruber, C.C. and J. Pleiss, *Lipase B from Candida antarctica binds to hydrophobic substrate-water interfaces via hydrophobic anchors surrounding the active site entrance*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012. **84**: p. 48-54.
54. Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar, and T.A. Jones, *The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica*. *Structure*, 1994. **2**(4): p. 293-308.
55. Idris, A. and A. Bukhari, *Immobilized Candida antarctica lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis*. *Biotechnology Advances*, 2012. **30**(3): p. 550-563.
56. Ohtani, T., H. Nakatsukasa, M. Kamezawa, H. Tachibana, and Y. Naoshima, *Enantioselectivity of Candida antarctica lipase for some synthetic substrates including aliphatic secondary alcohols*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998. **4**(1-2): p. 53-60.
57. Anders, M. *Rational redesign of Candida antarctica lipase B*. PhD thesis, 2005. University in Stockholm.
58. Martinelle, M., M. Holmquist, and K. Hult, *On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1995. **1258**(3): p. 272-276.
59. Zisis, T., P.L. Freddolino, P. Turunen, M.C.F. van Teeseling, A.E. Rowan, and K.G. Blank, *Interfacial Activation of Candida antarctica Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation*. *Biochemistry*, 2015. **54**(38): p. 5969-5979.



60. Veld, M.A.J. *Candida antarctica Lipase B catalysis in organic, polymer and supramolecular chemistry* PhD, 2010. Eindhoven University of Technology.
61. Trodler, P. and J. Pleiss, *Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents*. BMC Structural Biology, 2008. **8**(1): p. 1-10.
62. Li, W., B. Yang, Y. Wang, D. Wei, C. Whiteley, and X. Wang, *Molecular modeling of substrate selectivity of Candida antarctica lipase B and Candida rugosa lipase towards c9, t11- and t10, c12-conjugated linoleic acid*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **57**(1–4): p. 299-303.
63. Kazlauskas, R.J., A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, and L.A. Cuccia, *A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from Pseudomonas cepacia, and lipase from Candida rugosa*. The Journal of Organic Chemistry, 1991. **56**(8): p. 2656-2665.
64. Hæffner, F., T. Norin, and K. Hult, *Molecular Modeling of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Transesterification Reactions*. Biophysical Journal, 1998. **74**(3): p. 1251-1262.
65. Rodrigues, R.C. and R. Fernandez-Lafuente, *Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **66**(1–2): p. 15-32.
66. Derewenda, Z.S., U. Derewenda, and G.G. Dodson, *The crystal and molecular structure of the Rhizomucor miehei triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution*. Journal of Molecular Biology, 1992. **227**(3): p. 818-839.
67. Peters, G.H., O.H. Olsen, A. Svendsen, and R.C. Wade, *Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in Rhizomucor miehei lipase*. Biophysical Journal, 1996. **71**(1): p. 119-29.
68. Daiha, K.d.G., R. Angeli, S.D. de Oliveira, and R.V. Almeida, *Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting*. PLoS ONE, 2015. **10**(6): p. e0131624.
69. Jaeger, K.-E. and T. Eggert, *Lipases for biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology, 2002. **13**(4): p. 390-397.
70. Haldane, J.B.S., *Enzymes*. 1930, London; New York: Longmans, Green and Co.
71. Sharma, S. and S.S. Kanwar, *Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**: p. 15.
72. Gotor-Fernández, V., R. Brieva, and V. Gotor, *Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006. **40**(3–4): p. 111-120.
73. Aravindan, R., P. Anbumathi, and T. Viruthagiri, *Lipase applications in food industry*. Indian Journal of Biotechnology, 2007. **6**: p. 141-158.
74. Khan, N.R. and V.K. Rathod, *Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review*. Process Biochemistry, 2015. **50**(11): p. 1793-1806.
75. Ansorge-Schumacher, M.B. and O. Thum, *Immobilised lipases in the cosmetics industry*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6475-6490.

76. Guyot, B., B. Bosquette, M. Pina, and J. Graille, *Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from Candida antarctica in solvent-free medium*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(6): p. 529-532.
77. Yang, H., Y. Mu, H. Chen, Z. Xiu, and T. Yang, *Enzymatic synthesis of feruloylated lysophospholipid in a selected organic solvent medium*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 3317-22.
78. Stamatis, H., V. Sereti, and F.N. Kolisis, *Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001. **11**(4-6): p. 323-328.
79. Topakas, E., H. Stamatis, M. Mastihubova, P. Biely, D. Kekos, B.J. Macris, and P. Christakopoulos, *Purification and characterization of a Fusarium oxysporum feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **33**(5): p. 729-737.
80. Topakas, E., H. Stamatis, P. Biely, D. Kekos, B.J. Macris, and P. Christakopoulos, *Purification and characterization of a feruloyl esterase from Fusarium oxysporum catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures*. Journal of Biotechnology, 2003. **102**(1): p. 33-44.
81. Thörn, C., H. Gustafsson, and L. Olsson, *Immobilization of feruloyl esterases in mesoporous materials leads to improved transesterification yield*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011. **72**(1-2): p. 57-64.
82. Yu, X., Y. Li, and D. Wu, *Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004. **30**(2): p. 69-73.
83. Compton, D.L., J.A. Laszlo, and M.A. Berhow, *Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. **77**(5): p. 513-519.
84. Sun, S., F. Qin, Y. Bi, J. Chen, G. Yang, and W. Liu, *Enhanced transesterification of ethyl ferulate with glycerol for preparing glyceryl diferulate using a lipase in ionic liquids as reaction medium*. Biotechnology Letters, 2013. **35**(9): p. 1449-1454.
85. Sorour, N., S. Karboune, R. Saint-Louis, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed synthesis of structured phenolic lipids in solvent-free system using flaxseed oil and selected phenolic acids as substrates*. Journal of Biotechnology, 2012. **158**(3): p. 128-36.
86. Sabally, K., S. Karboune, F.K. Yebaoh, and S. Kermasha, *Enzymatic esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media*. Biocatalysis and Biotransformation, 2005. **23**(1): p. 37-44.
87. Sorour, N., S. Karboune, R. Saint-Louis, and S. Kermasha, *Enzymatic synthesis of phenolic lipids in solvent-free medium using flaxseed oil and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid*. Process Biochemistry, 2012. **47**(12): p. 1813-1819.
88. Katsoura, M.H., A.C. Polydera, L.D. Tsironis, M.P. Petraki, S.K. Rajačić, A.D. Tselepis, and H. Stamatis, *Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification*. New Biotechnology, 2009. **26**(1-2): p. 83-91.

89. Sun, S., S. Zhu, and Y. Bi, *Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated structured lipids by the transesterification of ethyl ferulate with castor oil*. Food Chemistry, 2014. **158**: p. 292-5.
90. Xiao, P., A. Zhang, L. Zheng, and Y. Song, *Straightforward Enzyme-Catalyzed Asymmetric Synthesis of Caffeic Acid Esters in Enantioenriched Form*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014. **53**(29): p. 11638-11645.
91. Sabally, K., S. Karboune, F.K. Yeboah, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed esterification of selected phenolic acids with linolenyl alcohols in organic solvent media*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005. **127**(1): p. 17-27.
92. Karboune, S., R. St-Louis, and S. Kermasha, *Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2008. **52-53**: p. 96-105.
93. Durand, E., J. Lecomte, B. Baréa, E. Dubreucq, R. Lortie, and P. Villeneuve, *Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids*. Green Chemistry, 2013. **15**(8): p. 2275.
94. Yang, Z., Z. Guo, and X. Xu, *Ionic liquid-assisted solubilization for improved enzymatic esterification of phenolic acids*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2012. **89**(6): p. 1049-1055.
95. Ciftci, D. and M.D.A. Saldaña, *Enzymatic synthesis of phenolic lipids using flaxseed oil and ferulic acid in supercritical carbon dioxide media*. The Journal of Supercritical Fluids, 2012. **72**: p. 255-262.
96. Karam, R., S. Karboune, R. St-Louis, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed acidolysis of fish liver oil with dihydroxyphenylacetic acid in organic solvent media*. Process Biochemistry, 2009. **44**(11): p. 1193-1199.
97. Chen, H.C., J.H. Chen, C. Chang, and C.J. Shieh, *Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology*. Ultrasonics Sonochemistry, 2011. **18**(1): p. 455-9.
98. Zoumpantioti, M., E. Merianou, T. Karandreas, H. Stamatis, and A. Xenakis, *Esterification of phenolic acids catalyzed by lipases immobilized in organogels*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(10): p. 1457-62.
99. Sharma, C.K., G.S. Chauhan, and S.S. Kanwar, *Synthesis of medically important ethyl cinnamate ester by porcine pancreatic lipase immobilized on poly(AAc-co-HPMA-cl-EGDMA) hydrogel*. Journal of Applied Polymer Science, 2011. **121**(5): p. 2674-2679.
100. Kumar, A. and S.S. Kanwar, *Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase*. Bioresource Technology, 2011. **102**(3): p. 2162-2167.
101. Horchani, H., N. Ben Salem, Z. Zarai, A. Sayari, Y. Gargouri, and M. Chaâbouni, *Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized Staphylococcus aureus lipase: Optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity*. Bioresource Technology, 2010. **101**(8): p. 2809-2817.
102. Kumar, V., F. Jahan, K. Kameswaran, R.V. Mahajan, and R.K. Saxena, *Eco-friendly methodology for efficient synthesis and scale-up of 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate*

using *Rhizopus oryzae* lipase and its biological evaluation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014. **41**(6): p. 907-12.

103. Biańska-Florjańczyk, E., J. Krzyczkowska, I. Stolarzewicz, and A. Kapturowska, *Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of Yarrowia lipolytica KKP 379 biomass*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012. **74**(3-4): p. 241-245.

104. Buisman, G.J.H., C.T.W. Van Helteren, G.F.H. Kramer, J.W. Veldsink, J.T.P. Derksen, and F.P. Cuperus, *Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants*. *Biotechnology Letters*, 1998. **20**(2): p. 131-136.

105. Yang, Z., Z. Guo, and X. Xu, *Enzymatic lipophilisation of phenolic acids through esterification with fatty alcohols in organic solvents*. *Food Chemistry*, 2012. **132**(3): p. 1311-1315.

106. Sun, S., L. Shan, Y. Liu, Q. Jin, X. Wang, and Z. Wang, *A novel, two consecutive enzyme synthesis of feruloylated monoacyl- and diacyl-glycerols in a solvent-free system*. *Biotechnology Letters*, 2007. **29**(12): p. 1947-50.

107. Sun, S., L. Shan, Q. Jin, Y. Liu, and X. Wang, *Solvent-free synthesis of glyceryl ferulate using a commercial microbial lipase*. *Biotechnology Letters*, 2007. **29**(6): p. 945-9.

108. Xin, J.-y., L. Zhang, L.-l. Chen, Y. Zheng, X.-m. Wu, and C.-g. Xia, *Lipase-catalyzed synthesis of feruloyl oleins in solvent-free medium*. *Food Chemistry*, 2009. **112**(3): p. 640-645.

109. Sun, S., L. Shan, Y. Liu, Q. Jin, Y. Song, and X. Wang, *Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. **57**(1-4): p. 104-108.

110. Sun, S., X. Chen, Y. Bi, and G. Yang, *Selective separation of mono glyceryl ferulate using water from an ionic liquid solution of enzymatic transesterification*. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2014. **91**(8): p. 1339-1345.

111. Yu, Y., Y. Zheng, J. Quan, C.-Y. Wu, Y.-J. Wang, C. Branford-White, and L.-M. Zhu, *Enzymatic Synthesis of Feruloylated Lipids: Comparison of the Efficiency of Vinyl Ferulate and Ethyl Ferulate as Substrates*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010. **87**(12): p. 1443-1449.

112. Cassani, J., H. Luna, A. Navarro, and E. Castillo, *Comparative esterification of phenylpropanoids versus hydrophenylpropanoids acids catalyzed by lipase in organic solvent media*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2007. **10**(4): p. 508-513.

113. Sabally, K., S. Karboune, R. St-Louis, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids*. *Journal of Biotechnology*, 2006. **127**(1): p. 167-76.

114. Chen, H.C., H.Y. Ju, Y.K. Twu, J.H. Chen, C.M. Chang, Y.C. Liu, C. Chang, and C.J. Shieh, *Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM*. *New Biotechnology*, 2010. **27**(1): p. 89-93.

115. Sun, S. and S. Zhu, *Enzymatic preparation of castor oil-based feruloylated lipids using ionic liquids as reaction medium and kinetic model*. *Industrial Crops and Products*, 2015. **73**: p. 127-133.

116. Karboune, S., M. Safari, B.M. Lue, F.K. Yeboah, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed biosynthesis of cinnamoylated lipids in a selected organic solvent medium*. Journal of Biotechnology, 2005. **119**(3): p. 281-90.
117. Hoffmann, I., V.D. Silva, and M. Da G. Nascimento, *Enantioselective resolution of (R,S)-1-phenylethanol catalyzed by lipases immobilized in starch films*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2011. **22**(8): p. 1559-1567.
118. Compton, D.L. and J.W. King, *Lipase-catalyzed synthesis of triolein-based sunscreens in supercritical CO<sub>2</sub>*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001. **78**(1): p. 43-47.
119. Salihu, A. and M.Z. Alam, *Solvent tolerant lipases: A review*. Process Biochemistry, 2015. **50**(1): p. 86-96.
120. Laane, C., S. Boeren, K. Vos, and C. Veeger, *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. Biotechnology and Bioengineering, 1987. **30**(1): p. 81-7.
121. Wang, J., J. Li, L. Zhang, S. Gu, and F. Wu, *Lipase-catalyzed Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Ionic Liquids: Effect of Specific Ions and Reaction Parameters*. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2013. **21**(12): p. 1376-1385.
122. Chen, B., H. Liu, Z. Guo, J. Huang, M. Wang, X. Xu, and L. Zheng, *Lipase-catalyzed esterification of ferulic acid with oleyl alcohol in ionic liquid/isooctane binary systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(4): p. 1256-1263.
123. Dossat, V., D. Combes, and A. Marty, *Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil*. Enzyme and Microbial Technology, 2002. **30**(1): p. 90-94.
124. Stevenson, D.E., S.G. Parkar, J. Zhang, R.A. Stanley, D.J. Jensen, and J.M. Cooney, *Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by Candida antarctica lipase B (Novozym 435®)*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(5): p. 1078-1086.
125. Zheng, Y., X.-M. Wu, C. Branford-White, X. Ning, J. Quan, and L.-M. Zhu, *Enzymatic synthesis and characterization of novel feruloylated lipids in selected organic media*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **58**(1-4): p. 65-71.
126. Zheng, Y., C. Branford-White, X.-M. Wu, C.-Y. Wu, J.-G. Xie, J. Quan, and L.-M. Zhu, *Enzymatic Synthesis of Novel Feruloylated Lipids and Their Evaluation as Antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010. **87**(3): p. 305-311.
127. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo*. 2008, Beograd.
128. Segel, I.H., *Enzyme Kinetics : Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. 1975, Hoboken, USA: Wiley-Interscience.
129. Cleland, W.W., *The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects, 1963. **67**: p. 104-137.
130. Pessoa, F.L., S.P. Magalhaes, and P.W. Falcao, *Production of biodiesel via enzymatic ethanolysis of the sunflower and soybean oils: modeling*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **161**(1-8): p. 238-44.
131. Bezbradica, D., M. Stojanović, D. Veličković, A. Dimitrijević, M. Carević, M. Mihailović, and N. Milosavić, *Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic*

*acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester*. Biochemical Engineering Journal, 2013. **71**(0): p. 89-96.

132. Lopresto, C.G., V. Calabrò, J.M. Woodley, and P. Tufvesson, *Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized Candida antarctica lipase B*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014. **110**: p. 64-71.

133. Šušković, J. and S. Matošić, *Tehnologija enzima*. Univerzitet u Zagrebu: Prehrambeno-biotehnološki fakultet

134. Figueroa-Espinoza, M.C. and P. Villeneuve, *Phenolic acids enzymatic lipophilization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(8): p. 2779-87.

135. Itabaiana, I., L.S. de Mariz e Miranda, and R.O.M.A. de Souza, *Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **85-86**: p. 1-9.

136. Laszlo, J.A., D.L. Compton, F.J. Eller, S.L. Taylor, and T.A. Isbell, *Packed-bed bioreactor synthesis of feruloylated monoacyl- and diacylglycerols: clean production of a "green" sunscreen*. Green Chemistry, 2003. **5**(4): p. 382-386.

137. Wang, J., S.-S. Gu, H.-S. Cui, X.-Y. Wu, and F.-A. Wu, *A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor*. Bioresource Technology, 2014. **158**(0): p. 39-47.

138. Yoshida, Y., Y. Kimura, M. Kadota, T. Tsuno, and S. Adachi, *Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized Candida antarctica lipase at high temperature*. Biotechnology Letters, 2006. **28**(18): p. 1471-1474.

139. Lee, C.C., H.C. Chen, H.Y. Ju, J.H. Chen, C.H. Kuo, Y.L. Chung, Y.C. Liu, and C.J. Shieh, *Green and efficient production of octyl hydroxyphenylpropionate using an ultrasound-assisted packed-bed bioreactor*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012. **39**(4): p. 655-660.

140. Chen, H.-C., C.-H. Kuo, Y.-K. Twu, J.-H. Chen, C.-M.J. Chang, Y.-C. Liu, and C.-J. Shieh, *A continuous ultrasound-assisted packed-bed bioreactor for the lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2011. **86**(10): p. 1289-1294.

141. Piao, J. and S. Adachi, *Enzymatic preparation of fatty acid esters of sugar alcohols by condensation in acetone using a packed-bed reactor with immobilized Candida antarctica lipase*. Biocatalysis and Biotransformation, 2004. **22**(4): p. 269-274.

142. Nagaki, A., D. Ichinari, and J.I. Yoshida, *Reactions of organolithiums with dialkyl oxalates. A flow microreactor approach to synthesis of functionalized  $\alpha$ -keto esters*. Chemical Communications, 2013. **49**(31): p. 3242-3244.

143. Mills, P.L., D.J. Quiram, and J.F. Ryley, *Microreactor technology and process miniaturization for catalytic reactions-A perspective on recent developments and emerging technologies*. Chemical Engineering Science, 2007. **62**(24): p. 6992-7010.

144. Wang, J., S.-S. Gu, H.-S. Cui, L.-Q. Yang, and X.-Y. Wu, *Rapid synthesis of propyl caffeate in ionic liquid using a packed bed enzyme microreactor under continuous-flow conditions*. Bioresource Technology, 2013. **149**(0): p. 367-374.

145. Marques, M.P.C. and P. Fernandes, *Microfluidic devices: Useful tools for bioprocess intensification*. *Molecules*, 2011. **16**(10): p. 8368-8401.
146. Guisán, J.M., *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2006: Humana Press.
147. Prlainović, N.Ž. *Proučavanje mehanizma enzimske sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona*. Doktorska disertacija, 2012. Univerzitet u Beogradu.
148. Yu, W.H., N. Li, D.S. Tong, C.H. Zhou, C.X. Lin, and C.Y. Xu, *Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review*. *Applied Clay Science*, 2013. **80–81**(0): p. 443-452.
149. Karagulyan, H., V. Gasparyan, and S. Decker, *Immobilization of Fungal  $\beta$ -Glucosidase on Silica Gel and Kaolin Carriers*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008. **146**(1-3): p. 39-47.
150. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**: p. 248-54.
151. Kedare, S. and R.P. Singh, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. *Journal of Food Science and Technology*, 2011. **48**(4): p. 412-422.
152. Jiang, Z.-H., J.-R. Wang, M. Li, Z.-Q. Liu, K.-Y. Chau, C. Zhao, and L. Liu, *Hemiterpene Glucosides with Anti-Platelet Aggregation Activities from *Ilex pubescens**. *Journal of Natural Products*, 2005. **68**(3): p. 397-399.
153. Ribeiro, J.M., M. Schneider, and J.A. Guimarães, *Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus**. *Biochemical Journal*, 1995. **308**(Pt 1): p. 243-249.
154. Veličković, D. *Proučavanje transglukozilacionih reakcija katalizovanih maltazom iz *Saccharomyces cerevisiae**. Doktorska disertacija, 2011. Univerzitet u Beogradu.
155. Grbavčić, S. *Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u detergentsima*. Doktorska disertacija, 2014. Univerzitet u Beogradu.
156. Otto, R.T., H. Scheib, U.T. Bornscheuer, J. Pleiss, C. Syldatk, and R.D. Schmid, *Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids*. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 2000. **8**(4-6): p. 201-211.
157. Safari, M., S. Karboune, R. St-Louis, and S. Kermasha, *Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by incorporation of selected phenolic acids into triolein*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2006. **24**(4): p. 272-279.
158. Lee, G.-S., A. Widjaja, and Y.-H. Ju, *Enzymatic Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives*. *Biotechnology Letters*, 2006. **28**(8): p. 581-585.
159. [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com).
160. Adisakwattana, S., W.H. Hsu, and S. Yibchok-anun, *Mechanisms of p-methoxycinnamic acid-induced increase in insulin secretion*. *Hormone and Metabolic Research Journal*, 2011. **43**(11): p. 766-73.
161. Chen, H., G. Li, P. Zhan, and X. Liu, *Ligustrazine derivatives. Part 5: design, synthesis and biological evaluation of novel ligustrazinyloxy-cinnamic acid derivatives as potent cardiovascular agents*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011. **46**(11): p. 5609-15.

162. Kong, Y.H., Y.O. Jo, C.W. Cho, D. Son, S. Park, J. Rho, and S.Y. Choi, *Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008. **31**(5): p. 946-8.
163. Nanjundaiah, S.M., H.N. Annaiah, and S.M. Dharmesh, *Gastroprotective Effect of Ginger Rhizome (Zingiber officinale) Extract: Role of Gallic Acid and Cinnamic Acid in H(+), K(+)-ATPase/H. pylori Inhibition and Anti-Oxidative Mechanism*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011. **2011**: p. 249487.
164. Prabhakar, P.K. and M. Doble, *Interaction of cinnamic acid derivatives with commercial hypoglycemic drugs on 2-deoxyglucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(18): p. 9835-44.
165. Teixeira, J., P. Soares, S. Benfeito, A. Gaspar, J. Garrido, M.P. Murphy, and F. Borges, *Rational discovery and development of a mitochondria-targeted antioxidant based on cinnamic acid scaffold*. Free Radical Research., 2012. **46**(5): p. 600-11.
166. Yen, G.C., Y.L. Chen, F.M. Sun, Y.L. Chiang, S.H. Lu, and C.J. Weng, *A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **44**(3): p. 281-7.
167. Zofou, D., M. Tene, P. Tane, and V.P. Titanji, *Antimalarial drug interactions of compounds isolated from Kigelia africana (Bignoniaceae) and their synergism with artemether, against the multidrug-resistant W2mef Plasmodium falciparum strain*. Parasitology Research, 2012. **110**(2): p. 539-44.
168. Magnusson, A.O., J.C. Rotticci-Mulder, A. Santagostino, and K. Hult, *Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of Candida antarctica lipase B*. Chembiochem, 2005. **6**(6): p. 1051-6.
169. Lue, B.-M., S. Karboune, F.K. Yeboah, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2005. **80**(4): p. 462-468.
170. Rahman, M.B.A., N. Chaibakhsh, and M. Basri, *Effect of Alcohol Structure on the Optimum Condition for Novozym 435-Catalyzed Synthesis of Adipate Esters*. Biotechnology Research International, 2011.
171. Kontogianni, A., V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, and F.N. Kolisis, *Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(10): p. 655-660.
172. Halling, P., *Enzymic Conversions in Organic and Other Low-Water Media*, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 259-285.
173. Choo, W.S. and E.J. Birch, *Radical scavenging activity of lipophilized products from lipase-catalyzed transesterification of triolein with cinnamic and ferulic acids*. Lipids, 2009. **44**(2): p. 145-52.
174. Choo, W.S., E.J. Birch, and I. Stewart, *Radical scavenging activity of lipophilized products from transesterification of flaxseed oil with cinnamic acid or ferulic acid*. Lipids, 2009. **44**(9): p. 807-815.



175. Simić, A., D. Manojlović, D. Šegan, and M. Todorović, *Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics*. *Molecules*, 2007. **12**(10): p. 2327.
176. Widjaja, A., T.-H. Yeh, and Y.-H. Ju, *Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2008. **39**(5): p. 413-418.
177. Hari Krishna, S., S. Divakar, S.G. Prapulla, and N.G. Karanth, *Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei**. *Journal of Biotechnology*, 2001. **87**(3): p. 193-201.
178. Fu, B. and P.T. Vasudevan, *Effect of Solvent–Co-solvent Mixtures on Lipase-Catalyzed Transesterification of Canola Oil†*. *Energy & Fuels*, 2010. **24**(9): p. 4646-4651.
179. Tarahomjoo, S. and I. Alemzadeh, *Surfactant production by an enzymatic method*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003. **33**(1): p. 33-37.
180. Stojanović, M., D. Velićković, A. Dimitrijević, N. Milosavić, Z. Knežević-Jugović, and D. Bezbradica, *Lipase-Catalyzed Synthesis of Ascorbyl Oleate in Acetone: Optimization of Reaction Conditions and Lipase Reusability*. *Journal of Oleo Science*, 2013. **62**(8): p. 591-603.
181. Büchs, J., U. Maier, C. Milbradt, and B. Zoels, *Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. **68**(6): p. 589-593.
182. Blanch, H.W. and D.S. Clark, *Biochemical Engineering*. second ed. 1995, Oxford: Taylor & Francis.
183. Fransson, L. *Enzyme substrate solvent interactions*. PhD thesis, 2008. University of Stockholm.
184. Ankudey, E.G. *Biocatalyst and Bioprocess Engineering for Alkene Epoxidation*. PhD thesis, 2008. University of Iowa.
185. García-Alles, L.F. and V. Gotor, *Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998. **59**(2): p. 163-170.
186. Blahušiak, M., J. Marták, F. Miranda, Š. Schlosser, and J.A. Teixeira, *Effect of viscosity of a liquid membrane containing oleyl alcohol on the pertraction of butyric acid*. *Chemical Papers*, 2013. **67**(12): p. 1560-1568.
187. Allen, B.R., R.W. Coughlin, and M. Charles, *Fluidized-Bed Enzyme Reactors*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1979. **326**(1): p. 105-117.
188. Šaponjić, S. *Sinteza estara katalizovana imobilisanim lipazama u nevodnim sredinama*. Magistarska teza, 2009. Univerzitet u Beogradu.
189. Li, L., W. Du, D. Liu, L. Wang, and Z. Li, *Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006. **43**(1–4): p. 58-62.
190. Jeong, G.-T. and D.-H. Park, *Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil for Biodiesel Production with tert-Butanol*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008. **148**(1-3): p. 131-139.

191. Saponjić, S., Z.D. Knežević-Jugović, D.I. Bezbradica, M.G. Zuza, O.A. Saied, N. Bosković-Vragolović, and D.Z. Mijin, *Use of Candida rugosa lipase immobilized on sepabeads for the amyl caprylate synthesis: Batch and fluidized bed reactor study*. Electronic Journal of Biotechnology, 2010. **13**(6).
192. Damnjanović, J.J., M.G. Žuža, J.K. Savanović, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, N. Bošković-Vragolović, and Z.D. Knežević-Jugović, *Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012. **75**(0): p. 50-59.
193. Roy, I. and M.N. Gupta, *Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes*. Process Biochemistry, 2003. **39**(3): p. 325-332.
194. Ricca, E., V. Calabrò, S. Curcio, A. Basso, L. Gardossi, and G. Iorio, *Fructose production by inulinase covalently immobilized on Sepabeads in batch and fluidized bed bioreactor*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(3): p. 1180-1189.
195. Bailey, J.E. and D.F. Ollis, *Biochemical engineering fundamentals*. second ed. 1986, New York: McGraw-Hill.
196. Yadav, G.D. and P.S. Lathi, *Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases*. Biochemical Engineering Journal, 2003. **16**(3): p. 245-252.
197. Peter, C.P., Y. Suzuki, and J. Büchs, *Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **93**(6): p. 1164-1176.
198. Wilke, C.R. and P. Chang, *Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions*. AIChE Journal, 1955. **1**(2): p. 264-270.
199. Sun, J., Y. Jiang, L. Zhou, and J. Gao, *Optimization and kinetic study of immobilized lipase-catalyzed synthesis of ethyl lactate*. Biocatalysis and Biotransformation, 2010. **28**(4): p. 279-287.
200. Sivakumari, K., A.F.M.C. Rathinabai, P.K. Kaleena, P. Jayaprakash, and R. Srikanth, *Molecular Docking Study of Bark-derived Components of Cinnamomum Cassia on Aldose Reductase*. Indian Journal of Science and Technology, 2010. **3**: p. 1081-1088.
201. Haigh, K., S. Abidin, B. Saha, and G. Vladislavljević, *Pretreatment of Used Cooking Oil for the Preparation of Biodiesel Using Heterogeneous Catalysis*, in *UK Colloids 2011*, V. Starov and P. Griffiths, Editors. 2012, Springer: Berlin. p. 19-22.
202. Yadav, G.D. and K.M. Devi, *Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling*. Chemical Engineering Science, 2004. **59**(2): p. 373-383.
203. Kumar, N. and V. Pruthi, *Potential applications of ferulic acid from natural sources*. Biotechnology Reports, 2014. **4**(0): p. 86-93.
204. Nenadis, N., H.Y. Zhang, and M.Z. Tsimidou, *Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(7): p. 1874-9.

205. Sabally, K., S. Karboune, R. St-Louis, and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006. **83**(2): p. 101-107.
206. Sultana, R., *Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders*. Biochimica et Biophysica Acta, 2012. **1822**(5): p. 748-52.
207. Fabbri, B., S. Gualtieri, and C. Leonardi, *Modifications induced by the thermal treatment of kaolin and determination of reactivity of metakaolin*. Applied Clay Science, 2013. **73**(0): p. 2-10.
208. Šekuljica, N.Ž., N.Ž. Prlainović, J.R. Jovanović, A.B. Stefanović, V.R. Djokić, D.Ž. Mijin, and Z.D. Knežević-Jugović, *Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016: p. 1-12.
209. Duarte-Silva, R., M.A. Villa-García, M. Rendueles, and M. Díaz, *Structural, textural and protein adsorption properties of kaolinite and surface modified kaolinite adsorbents*. Applied Clay Science, 2014. **90**(0): p. 73-80.
210. Ilić, B.R., A.A. Mitrović, and L.R. Miličić, - *Thermal treatment of kaolin clay to obtain metakaolin*. Hemijska Industrija, 2010. **64**(4): p. 351-356.
211. Kakali, G., T. Perraki, S. Tsivilis, and E. Badogiannis, *Thermal treatment of kaolin: the effect of mineralogy on the pozzolanic activity*. Applied Clay Science, 2001. **20**(1–2): p. 73-80.
212. Castellano, M., A. Turturro, P. Riani, T. Montanari, E. Finocchio, G. Ramis, and G. Busca, *Bulk and surface properties of commercial kaolins*. Applied Clay Science, 2010. **48**(3): p. 446-454.
213. Horvath, E., J. Kristof, and R.L. Frost, *Vibrational Spectroscopy of Intercalated Kaolinites. Part I*. Applied Spectroscopy Reviews, 2010. **45**(2): p. 130-147.
214. Vaculíková, L., E. Plevová, S. Vallová, and I. Koutník, *Characterization and differentiation of kaolinites from selected czech deposits using infrared spectroscopy and differential thermal analysis*. Acta Geodynamica et Geomaterialia, 2011. **8**(1): p. 59-67.
215. Saikia, B.J. and G. Parthasarathy, *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Characterization of Kaolinite from Assam and Meghalaya, Northeastern India*. Journal of Modern Physics, 2010. **01**(04): p. 206-210.
216. Liew, Y.M., H. Kamarudin, A.M. Mustafa Al Bakri, M. Luqman, I. Khairul Nizar, C.M. Ruzaidi, and C.Y. Heah, *Processing and characterization of calcined kaolin cement powder*. Construction and Building Materials, 2012. **30**(0): p. 794-802.
217. Mihailović, M., M. Stojanović, K. Banjanac, M. Carević, N. Prlainović, N. Milosavić, and D. Bezbradica, *Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization*. Process Biochemistry, 2014. **49**(4): p. 637-646.
218. Haynes, C.A. and W. Norde, *Globular proteins at solid/liquid interfaces*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1994. **2**(6): p. 517-566.
219. Barral, S., M.A. Villa-García, M. Rendueles, and M. Díaz, *Interactions between whey proteins and kaolinite surfaces*. Acta Materialia, 2008. **56**(12): p. 2784-2790.

220. Sivachidambaram, S. and S. Rao, *Iodide Retention by Modified Kaolinite in the Context of Safe Disposal of High Level Nuclear Waste*. Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste, 2011. **16**(3): p. 192-200.
221. Yuan, J. and R.J. Pruett, *Zeta potential and related properties of kaolin clays from Georgia*. Minerals and Metallurgical Processing, 1998. **15**(1): p. 50-52.
222. Miller, J.D., J. Nalaskowski, B. Abdul, and H. Du, *Surface Characteristics of Kaolinite and Other Selected Two Layer Silicate Minerals*. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 2007. **85**(5): p. 617-624.
223. Tombácz, E. and M. Szekeres, *Surface charge heterogeneity of kaolinite in aqueous suspension in comparison with montmorillonite*. Applied Clay Science, 2006. **34**(1-4): p. 105-124.
224. Secundo, F., J. Miehé-Brendlé, C. Chelaru, E.E. Ferrandi, and E. Dumitriu, *Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition*. Microporous and Mesoporous Materials, 2008. **109**(1-3): p. 350-361.
225. Scherer, R., J.V. Oliveira, S. Pergher, and D. De Oliveira, *Screening of supports for immobilization of commercial porcine pancreatic lipase*. Materials Research, 2011. **14**(4): p. 483-492.
226. Brígida, A.I.S., Á.D.T. Pinheiro, A.L.O. Ferreira, and L.R.B. Gonçalves, *Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption to green coconut fiber*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008. **146**(1-3): p. 173-187.
227. Ralla, K., U. Sohling, D. Riechers, C. Kasper, F. Ruf, and T. Scheper, *Adsorption and separation of proteins by a smectitic clay mineral*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010. **33**(7): p. 847-861.
228. Bonomo, R.C.F., L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, R.C.I. Fontan, L.H. Mendes da Silva, and V.P.R. Minim, *Hydrophobic interaction adsorption of whey proteins: Effect of temperature and salt concentration and thermodynamic analysis*. Journal of Chromatography B, 2006. **844**(1): p. 6-14.
229. Chen, J. and Y. Sun, *Modeling of the salt effects on hydrophobic adsorption equilibrium of protein*. Journal of Chromatography A, 2003. **992**(1-2): p. 29-40.
230. Quiquampoix, H., S. Staunton, M.H. Baron, and R.G. Ratcliffe, *Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1993. **75**(0): p. 85-93.
231. Zhou, X., Q. Huang, S. Chen, and Z. Yu, *Adsorption of the insecticidal protein of Bacillus thuringiensis on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil*. Applied Clay Science, 2005. **30**(2): p. 87-93.
232. Assifaoui, A., L. Huault, C. Maissiat, C. Roullier-Gall, P. Jeandet, J. Hirschinger, J. Raya, M. Jaber, J.-F. Lambert, P. Cayot, R.D. Gougeon, and C. Loupiac, *Structural studies of adsorbed protein (betalactoglobulin) on natural clay (montmorillonite)*. RSC Advances, 2014. **4**(105): p. 61096-61103.

## **Biografija autora**

Sonja Jakovetić Tanasković rođena je 11.12.1984. godine u Kraljevu, gde je završila osnovnu školu "Dimitrije Tucović" i gimnaziju "Mirko Luković" i za uspehe tokom školovanja nagrađena je Vukovom diplomom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. Tokom studiranja tri puta je nagrađena diplomom Panta S. Tutundžić za izuzetan uspeh na studijama u redovnom roku. Diplomirala je na TMF-u na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 30.12.2008. sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom 9,72 u toku studija. Dobitnik je i priznanja Srpskog hemijskog društva za ukupan Izuzetan uspeh u toku studiranja. Doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom dr Zorice Knežević-Jugović, red. prof, upisala je 2009. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10,0. Nastavno-naučno veće održano 05.06.2014. godine donelo je odluku o davanju saglasnosti za produženje roka za završetak doktorskih studija doktoranda Sonje Jakovetić Tanasković za još dva semestra.

Od februara 2011. godine Sonja Jakovetić Tanasković je kao istraživač-pripravnik zaposlena na projektu "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" ev. br. III 46010, koji finansira Ministarstvo nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživača saradnika stiče u januaru 2013. godine. Od jula 2013. godine do jula 2015. godine bila je angažovana na zajedničkom naučno-istraživačkom projektu između Republike Srbije i Narodne Republike Kine, pod nazivom „Primena poljoprivrednog otpada za proizvodnju enzima“. Od septembra 2013. godine angažovana je u nastavi na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija na laboratorijskim vežbama iz predmeta: Biotehnološki praktikum 1 i Enzimsko inženjerstvo. Od juna 2014. do juna 2015. godine bila je angažovana na inovacionom projektu „Proizvodnja novih dijetetskih formulacija na bazi prirodnih proteina sa antioksidativnim i antitumorskim dejstvom“.

Koautor je 12 (dvanaest) radova u međunarodnim časopisima (šest M21, jedan M22, četiri M23 i jedan M24) i 19 (devetnaest) saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima od kojih su jedanaest štampani u celini (četiri M33, sedam M64, sedam M63, i jedan M64).

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а Сана Јаковетић Танасковић

број индекса 4001/00

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ЕНЗИМСКА ПРОЦЕДУРА СТАРА ФЕНОЛНА  
КИСЕЛИНА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 13.06.2016.

Сана Јаковетић Танасковић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Сонија Јакобевитић Танасковић  
Број индекса 4001109  
Студијски програм Биохемијска инжењерство и биотехнологија  
Наслов рада ЕНЗИМСКА ПРОИЗВОДЊА ЕСТАРА СРЕДЊИХ КИСЕЛИНА  
Ментор др Зорица Кнежевић - Југовић

Потписани/а Сонија Јакобевитић Танасковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 13.06.2016.

Сонија Јакобевитић Танасковић

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ЕНЗИМСКА ПРОИЗВОДНА ЕСТАРА ФЕНОЛНИЛ  
КИСЛАНИНА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 13. 08. 2016

*Снежана Јусебегвић Тамаковић*



