

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Marija M. Ćorović

**SINTEZA LIPOSOLUBILNIH
ASKORBIL-ESTARA KARBOKSILNIH KISELINA
KATALIZOVANA IMOBILISANIM LIPAZAMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Marija M. Ćorović

**SYNTHESIS OF LIPOSOLUBLE CARBOXYLIC
ACID ASCORBYL ESTERS CATALYZED BY
IMMOBILIZED LIPASES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTOR:

Dr Dejan Bezbradica,
vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Zorica Knežević-Jugović
redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Mirjana Antov
redovni profesor
Tehnološkog fakulteta
Univerziteta u Novom Sadu

Dr Aleksandar Marinković
docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija realizovana je na Katedri za biobemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata urađen je na Katedri za biobemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost na podršci, pomoći, razumevanju i angažovanju u svim fazama osmišljavanja i rada na tezi dugujem svom mentoru dr Dejanu Bezbradići.

Naročito sam zahvalna prof. dr Zorici Knežević-Jugović zbog velikog angažovanja kojim je omogućila da za izradu ove teze bude dostupna savremena oprema na kojoj su izvedeni brojni eksperimenti.

Iskreno zahvaljujem i ostalim članovima komisije, dr Aleksandru Marinkoviću na mogućnosti rada sa atraktivnim nosačima za imobilizaciju enzima i prof. dr Mirjani Antov na ukazanom poverenju.

Najtoplije zahvaljujem dr Nenadu Milosaviću, dr Dušanu Veličkoviću i dr Aleksandri Dimitrijević koji su me srdačno dočekali na Hemijskom fakultetu i pomagali mi u toku eksperimentalnog rada.

Veliko hvala kolegama doktorantima, kao i profesorima i tehničkom osoblju Katedre za biobemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi i iskrenoj podršci i savetima. Od srca zahvaljujem kolegama i prijateljima Milici, Mladenu i Sonji koji su mi pomagali i podržavali me u svakom trenutku i segmentu rada. Takođe, iskreno hvala Ani i Kaći na nesebičnoj podršci i pomoći u toku eksperimentalnog rada.

Na samom kraju, neizmerno sam zahvalna svojim najbližima, mami Milici, ocu Miloradu, sestri Neveni sa porodicom, prijateljima i suprugom Milanu na svemu što su za mene činili, na pruženoj podršci i razumevanju.

Sinteza liposolubilnih askorbil-estara karboksilnih kiselina katalizovana imobilisanim lipazama

REZIME

U okviru ove teze, ispitana je mogućnost efikasne i ekonomične proizvodnje askorbil-estara karboksilnih kiselina katalizovane imobilisanim lipazama. Testiran je veći broj lipaza, donora acil-ostatka i organskih rastvarača. Kao pogodni reakcioni medijumi su se pokazali polarni organski rastvarači u kojima je vitamin C rastvorljiv (*t*-butanol i aceton). Utvrđeno je da je lipaza tipa B producenta *Candida antarctica* (CAL B) najaktivniji katalizator u reakciji esterifikacije, kao i da je njen afinitet prema zasićenim karboksilnim kiselinama kratke i srednje dužine lanca i mono- i polinezasićenim masnim kiselinama dugog lanca veći nego prema zasićenim masnim kiselinama dugog lanca. Upravo ovi askorbil-estri pokazali su i najjače antioksidativno dejstvo. Optimizacija najznačajnijih reakcionih parametara vršena je statističkim planiranjem eksperimenata i primenom metode odzivnih površina u sintezi askorbil-oleata. Kao odzivna veličina je odabran specifični prinos koji predstavlja količinu proizvedenog estera po masi utrošene imobilisane lipaze, čime je ostvaren uvid u ekonomičnost enzimskog procesa. Na taj način je na 60°C, sa 0,135 M vitamina C, 0,2 % (w/v) lipaze, oleinskom kiselinom u višku (8:1) i pri početnom sadržaju vode od 0,018 % (v/v) postignut maksimalni specifični prinos od 16,7 mmol g⁻¹. Dalje povećanje efikasnosti procesa ostvareno je dodavanjem molekulskih sita u cilju uklanjanja viška vode, upotrebom katalizatora u konsektivnim reakcionim ciklusima i reaktivacijom delimično inaktivirane lipaze. Kinetička studija je pokazala da se početne brzine reakcije mogu modelovati ping-pong bi-bi mehanizmom sa inhibicijom vitaminom C. Finalnim modelom, u koji je uključen i efekat povratne reakcije hidrolize, dobro su fitovani i eksperimentalni podaci u dugim reakcionim vremenima.

S obzirom na to da je visoka cena korišćenog komercijalnog imobilisanog preparata (Novozym[®] 435) jedna od najvećih prepreka komercijalizaciji postupaka enzimske sinteze askorbil-estara, u sledećem delu disertacije ispitani su različiti nosači i metode za imobilizaciju CAL B u cilju dobijanja aktivnijih i/ili jeftinijih biokatalizatora. Najveću esterifikacionu aktivnost, sličnu Novozym[®]-u 435, pokazala je CAL B imobilisana na makroporozni hidrofobni nosač Purolite[®] MN102 na bazi stiren-divinilbenzena sa

tercijarnim amino-grupama, a troškovi njenog dobijanja bili su višestruko niži. Stoga su dalji eksperimenti bili usmereni na testiranje i poređenje performansi ovog preparata u dva različita reakciona sistema – šaržnom bioreaktoru sa mešanjem i bioreaktoru sa fluidizovanim slojem enzima i recirkulacijom supstrata. Pokazalo se da se u protočnom sistemu ostvaruju 40 % veće početne brzine reakcije, ali da je operativna stabilnost preparata veća u šaržnom sistemu. Hidrodinamički proračun je pokazao da je u oba sistema pod odgovarajućim radnim uslovima omogućeno kinetički kontrolisano odigravanje reakcije bez uticaja difuzionih limitacija, a da smicajni naponi nemaju značajan uticaj ni na desorpciju ni na inaktivaciju lipaze. Takođe je dokazano da se afinitet lipaze imobilisane na hidrofobnom nosaču prema hidrofobnom supstratu (oleinskoj kiselini) povećava, dok se istovremeno prema hidrofilnom supstratu (vitaminu C) smanjuje. Kinetički model kojim su najbolje fitovane početne brzine esterifikacije bio je ping-pong bi-bi model sa uključenom inhibicijom oleinskom kiselinom.

Finalni deo teze posvećen je ispitivanju mogućnosti korišćenja alternativnih donora acil-ostataka – masti i ulja, s obzirom na njihovu nisku cenu, prirodno poreklo i dostupnost. Pokazalo se da se na ovaj način mogu ostvariti visoki prinosi, do 112 mM (83 %), kao i da dobijene smeše askorbil-estara različitog sastava poseduju poboljšano antioksidativno dejstvo u odnosu na pojedinačne estere.

Ključne reči: vitamin C, karboksilne kiseline, lipaze, esterifikacija, liposolubilnost, antioksidans, optimizacija, imobilizacija, kinetika

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 677.027.622.1:577.15:577.164.2

Synthesis of liposoluble carboxylic acid ascorbyl esters catalyzed by immobilized lipases

ABSTRACT

In this thesis, possibility of efficient and economical production of carboxylic acid ascorbyl esters catalyzed by immobilized lipases was examined. Vast number of lipases, acyl donors, and organic solvents was tested. Suitable reaction mediums were polar organic solvents in which vitamin C was soluble (*t*-butanol and acetone). It was determined that lipase B from *Candida antarctica* (CAL B) was the most active catalyst in the esterification and that its affinity towards saturated short- and medium-chain carboxylic acids and unsaturated long-chain fatty acids was higher comparing to saturated long-chain fatty acids. Antioxidant activity of these esters was higher, as well. Optimization of crucial reaction parameters was performed by using statistically designed experimental plan and response surface methodology for the synthesis of ascorbyl oleate. As a response, specific yield, which represents amount of ester produced per mass of utilized immobilized lipase, was chosen, since it gave insight in cost effectiveness of enzymatic process. In that way, at 60 °C, with 0.135 M of vitamin C, 0.2 % (w/v) of lipase, oleic acid in excess (8:1), and at initial water content of 0.018 % (v/v), maximum specific ester yield of 16.7 mmol g⁻¹ was accomplished. Process efficiency was additionally enhanced by adding molecular sieves in order to remove excessive amount of water, by reusing biocatalyst in consecutive reaction cycles, and by reactivating partially inactivated lipase. Kinetic study revealed that initial reaction rates could be modeled by ping-pong bi-bi mechanism with inhibition by vitamin C. By including reverse reaction of hydrolysis in final model, experimental data at long reaction times were properly fitted, as well.

Considering the fact that high price of commercial immobilized preparation (Novozym[®] 435) that was used is one of the largest obstacles for commercialization of the enzyme-catalyzed ascorbyl ester synthesis processes, within subsequent part of dissertation different carriers and methods for the immobilization of CAL B were tested, in order to obtain more active and/or cheaper biocatalysts. Highest esterifying activity, similar to Novozym[®] 435, was demonstrated by CAL B immobilized onto styrene-divinylbenzene based macroporous hydrophobic carrier with tertiary amino groups, Purolite[®] MN102, but its production costs

were considerably lower. Hence, further experiments were focused on testing and comparison of performances of this preparation in two different reaction systems – mechanically stirred batch bioreactor and fluidized bed bioreactor with substrates recirculation. It was shown that 40 % higher initial reaction rates could be accomplished in continuous system, but operational stability of biocatalyst was higher in batch system. Hydrodynamic calculations revealed that in both systems, under proper operating conditions, kinetically controlled reaction with no influence of diffusion limitations was enabled and shear stress did not cause lipase desorption nor inactivation. Also, it was proven that affinity of lipase immobilized on hydrophobic carrier was enhanced towards hydrophobic substrate (oleic acid) and lowered towards hydrophilic substrate (vitamin C). Kinetic model which fitted initial reaction rates in best way was ping-pong bi-bi model with inhibition by oleic acid.

Final part of thesis was focused on examining the possibility of using alternative acyl donors – fats and oils, due to their low prices, natural origin, and availability. It was demonstrated that high yields, up to 112 mM (83 %), could be achieved in that way and that obtained ascorbyl esters mixtures of various composition possessed enhanced antioxidant activity comparing to single esters.

Keywords: vitamin C, carboxylic acids, lipases, esterification, liposolubility, antioxidant, optimization, immobilization, kinetics

Academic expertise: Engineering Technology

Major in: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number: 677.027.622.1:577.15:577.164.2

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. Hemijska sinteza L-askorbil-estara karboksilnih kiselina	5
2.2. Lipaze u sintezi askorbil-estara karboksilnih kiselina	8
2.2.1. Imobilizacija lipaza	9
2.2.2. Lipaze koje se primenjuju u sintezi askorbil-estara	13
2.2.2.1. Lipaza B iz <i>Candida antarctica</i>	13
2.2.2.1.1. Karakteristike lipaze tipa B iz <i>C. antarctica</i>	13
2.2.2.1.2. Imobilizacija lipaze B iz <i>C. antarctica</i>	15
2.2.2.2. Lipaza producenta <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	18
2.2.2.2.1. Karakteristike lipaze iz <i>T. lanuginosus</i>	18
2.2.2.2.2. Imobilizacija lipaze iz <i>T. lanuginosus</i>	19
2.2.2.3. Lipaza producenta <i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	21
2.2.2.3.1. Karakteristike lipaze iz <i>R. miehei</i>	21
2.2.2.3.2. Imobilizacija lipaze iz <i>R. miehei</i>	23
2.2.3. Uticaj reakcionih faktora na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina	25
2.2.3.1. Uticaj acil-donora na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina	28
2.2.3.2. Uticaj koncentracije i molskog odnosa supstrata na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina	31
2.2.3.3. Uticaj vrste i koncentracije lipaze na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina.	33
2.2.3.4. Uticaj reakcione sredine na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina.....	36
2.2.3.5. Uticaj temperature na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina.....	40
2.2.4. Enzimaska sinteza L-askorbil-estara karboksilnih kiselina u protočnim sistemima	41
2.3. Kinetika bisupstratnih enzimskih reakcija	45
2.3.1. Kinetika reakcija sinteze estara katalizovanih lipazama	48
2.4. Primena askorbil-estara karboksilnih kiselina	52
2.4.1. Askorbil-estri karboksilnih kiselina kao surfaktanti	52
2.4.1.1. Surfaktanti	52
2.4.1.2. Mogućnost primene askorbil-estara kao surfaktanata	53
2.4.2. Askorbil-estri karboksilnih kiselina kao antioksidansi	55

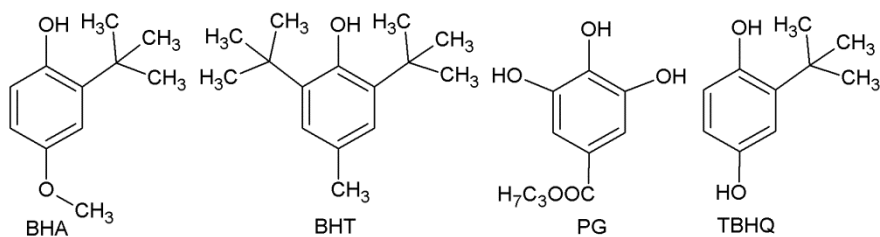
2.4.2.1. Antioksidansi.....	55
2.4.2.2. Vitamin C kao antioksidans	56
2.4.2.3. Mogućnost primene askorbil-estara kao antioksidanasa.....	58
2.4.3. Ostala fiziološka dejstva L-askorbil-estara karboksilnih kiselina.....	62
2.5. Prenos mase u enzimskim reaktorima.....	65
2.5.1. Šaržni bioreaktor sa mešanjem.....	67
2.5.2. Protočni bioreaktor sa fluidizovanim slojem.....	69
3. MATERIJALI I METODE.....	71
3.1. Materijali.....	71
3.2. Metode	74
3.2.1. Enzimska sinteza estara u šaržnom sistemu.....	74
3.2.2. Određivanje sadržaja vode u reakcionoj smeši metodom po Karlu i Fišeru	74
3.2.3. Kinetička studija	75
3.2.4. Kvantitativne analize uzoraka.....	75
3.2.5. Prečišćavanje proizvoda	76
3.2.6. Spektralne analize	76
3.2.7. Određivanje operativne stabilnosti biokatalizatora	76
3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti L-askorbil-estara.....	76
3.2.9. Centralni kompozitni rotabilni plan i metoda odzivnih površina	77
3.2.10. Imobilizacija lipaze na Purolite [®] MN102.....	80
3.2.11. Imobilizacija lipaze na Purolite [®] A109.....	80
3.2.12. Imobilizacija lipaze na Eupergit [®] C250L.....	80
3.2.13. Imobilizacija lipaze na Eudragit [®] S-100.....	81
3.2.14. Imobilizacija lipaze na nano-čestice SiO ₂	81
3.2.15. Određivanje hidrolitičke aktivnosti	83
3.2.16. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu	83
3.2.17. Enzimska sinteza L-askorbil-oleata u bioreктору sa fluidizovanim slojem imobilisane lipaze i recirkulacijom supstrata.....	84
3.2.18. Određivanje masnokiselinskog sastava masti i ulja	85
3.2.19. Statističke analize.....	86
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	87
4.1. Preliminarni eksperimenti.....	87

4.1.1. Analitičko i semipreparativno odvajanje askorbil-oleata primenom HPLC metode i spektralna analiza	87
4.1.2. Skrining lipaza kao potencijalnih katalizatora sinteze L-askorbil-oleata.....	88
4.2. Izbor organskog rastvarača i donora acil-ostatka za enzimsku sintezu L-askorbil-estara..	90
4.2.1. Uticaj organskog rastvarača na sintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina	90
4.2.2. Uticaj karboksilne kiseline na aktivnost imobilisane lipaze Novozym [®] 435.....	92
4.2.3. Uticaj acil-ostatka na antioksidativnu aktivnost askorbil-estara.....	94
4.3. Optimizacija reakcionih uslova za sintezu askorbil-oleata.....	96
4.3.1. Uticaj reakcionih faktora na biosintezu L-askorbil-oleata	96
4.3.1.1. Uticaj temperature na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata	96
4.3.1.2. Uticaj koncentracije biokatalizatora na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata	98
4.3.1.3. Uticaj koncentracije supstrata na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata	99
4.3.1.4. Uticaj koncentracije vode na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata.....	102
4.3.2. Optimizacija reakcionih parametara primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina	103
4.3.2.1. Uticaj i optimizacija temperature	105
4.3.2.2. Uticaj i optimizacija koncentracije enzima.....	107
4.3.2.3. Uticaj i optimizacija koncentracije supstrata	108
4.3.2.4. Uticaj i optimizacija početnog sadržaja vode	112
4.3.2.5. Evaluacija modela.....	114
4.3.3. Uticaj dodavanja molekulskih sita.....	114
4.3.4. Operativna stabilnost i reaktivacija biokatalizatora	115
4.4. Ispitivanje kinetike biosinteze L-askorbil-oleata	118
4.4.1. Uticaj reakcionih parametara na početnu brzinu esterifikacije	118
4.4.2. Analiza početnih brzina esterifikacije	124
4.5. Imobilizacija lipaze tipa B iz <i>C. antarctica</i>	129
4.5.1. Imobilizacija CAL B na Eupergit [®] C250L.....	129
4.5.2. Imobilizacija CAL B na na Eudragit [®] S-100.....	132
4.5.3. Imobilizacija CAL B na nano-čestice silicijum-dioksida.....	134
4.5.4. Imobilizacija lipaze na Purolite [®] nosače.....	137
4.5.5. Ispitivanje aktivnosti imobilisanih preparata u reakciji esterifikacije vitamina C i oleinske kiseline.....	140

4.5.6. Imobilizacija CAL B na Purolite® MN102	142
4.5.6.1. Optimizacija uslova za imobilizaciju CAL B na Purolite® MN102.....	142
4.5.6.2. Ispitivanje operativne stabilnosti imobilisanog enzima u sintezi L-askorbil-oleata.....	147
4.5.6.3. Procena troškova dobijanja CAL B imobilisane na Purolite® MN102.....	148
4.6. Sinteza L-askorbil-oleata katalizovana lipazom tipa B iz kvasca <i>C. antarctica</i> imobilisanom na Purolite® MN102 u šaržnom bioreaktoru i bioreaktoru sa fluidizovanim slojem.....	149
4.6.1. Optimizacija uslova sinteze L-askorbil-oleata katalizovane lipazom tipa B iz <i>C. antarctica</i> imobilisanom na Purolite® MN102	149
4.6.2. Kinetička studija	156
4.6.3. Poređenje prenosa mase u dva sistema, šaržnom i reaktoru sa fluidizovanim slojem	160
4.6.4. Poređenje operativne stabilnosti imobilisane lipaze u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom bioreaktoru.....	166
4.7. Enzimaska sinteza askorbil-estara primenom polinezasićenih masnih kiselina i masti i ulja kao acil-donora.....	168
4.7.1. Enzimaska sinteza askorbil-linolata	168
4.7.2. Enzimaska sinteza smeše L-askorbil-estara masnih kiselina u reakciji transesterifikacije sa uljima i mastima kao donorima acil-ostatka	171
4.7.2.1. Razvoj HPLC metode za odvajanje smeša askorbil-estara masnih kiselina nastalih transesterifikacijom sa mastima i uljima	171
4.7.2.2. Optimizacija reakcionih faktora i karakterizacija proizvoda	174
5. ZAKLJUČAK.....	180
6. LITERATURA	183

1. UVOD

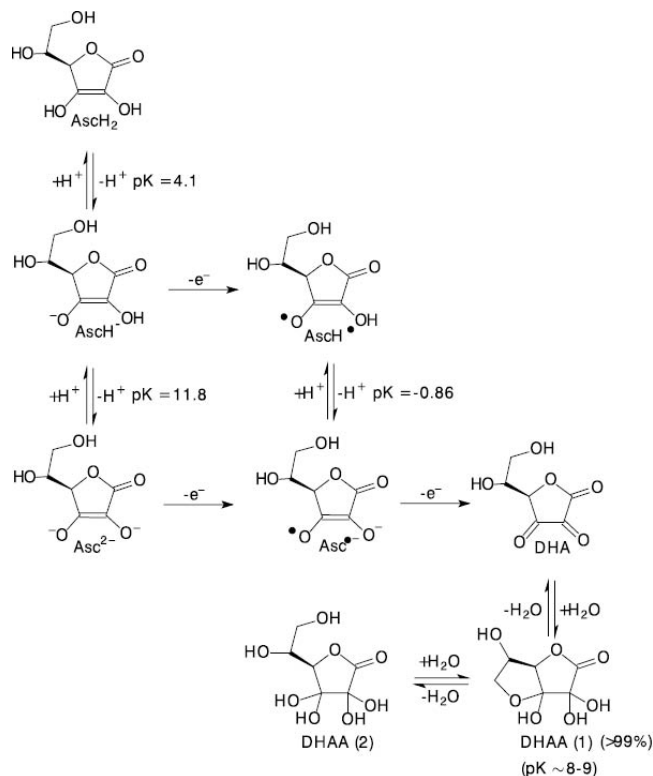
Prehrambeni i kozmetički proizvodi sa visokim sadržajem lipida, naročito mono- i polinezasićenih masnih kiselina, podložni su kvarenju izazvanom oksidativnim procesima. Autooksidacija lipida je lančani proces koji započinje “napadom” slobodnih radikala na lipide u kome nastaju lipidni hidroperoksidi čijim se daljim razlaganjem formiraju jedinjenja kao što su peroksidi, aldehidi, ketoni, niže masne i oksidne kiseline. Navedene klase jedinjenja su odgovorne za užeglost namirnica. Produžavanje roka upotrebe i očuvanje nutritivne vrednosti lipofilnih proizvoda može se postići korišćenjem prirodnih i sintetskih aditiva sa antioksidativnim dejstvom (1, 2).



Slika 1.1. Sintetski antioksidansi.

Antioksidansi mogu biti jedinjenja različite hemijske strukture – fenoli, hinoni, organske kiseline, sumporna jedinjenja i enzimi, i njihovo dejstvo može biti zasnovano na različitim mehanizmima – inaktivaciji lipidnih slobodnih radikala, sprečavanju razlaganja hidroperoksida na slobodne radikale, sinergističkom dejstvu sa drugim antioksidansima itd. (3). Osnovni preduslovi za korišćenje nekog prirodnog ili sintetskog jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom kao aditiva u kozmetičkim proizvodima ili hrani su da ne menja boju, miris i ukus proizvoda u koji se dodaje, da je liposolubilno, netoksično i stabilno tokom dužeg vremenskog perioda i na povišenim temperaturama (3). Hemijski sintetisani antioksidansi (butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), propil-galat (PG) i *tert*-butil-hidrohinon (TBHQ)), koji se uglavnom primenjuju u ove svrhe, pod fiziološkim uslovima se razlažu do toksičnih supstanci, pa je opravdanost njihove upotrebe pod znakom pitanja (slika 1.1.) (4, 5). Među mogućim neželjenim efektima ovih aditiva u živim sistemima najalarmantnije je potencijalno kancerogeno dejstvo. Poznata je činjenica da se samo oko 50 % BHA unetog u organizam izlučuje putem mokraćne dok se preostala količina akumulira u adipoznom tkivu (6). Osim toga, u reakcijama njihove sinteze upotrebljavaju se rastvarači i katalizatori koji nisu biokompatibilni, a zbog izostanka

regioselektivnosti i niskih prinosa, izolovanje i prečišćavanje proizvoda je komplikovano. Iz tih razloga, nameće se potreba za pronalaženjem novih, savremenijih antioksidanasa koji će zadovoljavati uslov lipofilnosti i biti bezbedni za upotrebu (7).



Slika 1.2. Ravnoteža i redoks vrste u sistemu askorbinska kiselina – dehidroaskorbinska kiselina. AscH₂ (askorbinska kiselina), AscH⁻ (askorbat-monoanjon), Asc²⁻ (askorbat-dianjon), AscH[•] (askorbil-radikal), Asc^{•-} (askorbat-radikal), DHA (dehidroaskorbat), DHAA(1) i DHAA(2) (hidrolizovane forme dehidroaskorbata) (8).

L-askorbinska kiselina je jedan od najrasprostranjenijih prirodnih hidrosolubilnih (rastvara se 33 g u 100 mL vode) antioksidanasa (9). Javlja se u nekoliko oblika pri čemu je najzastupljenija forma (99,95 %) pod fiziološkim uslovima askorbat-monoanjon (8). U svom antioksidativnom delovanju ovaj molekul stupa u reakciju sa reaktivnim radikalskim vrstama i lipidnim hidroperoksidima, otpušta jedan elektron i pri tome se formira manje reaktivni askorbil-radikal. Nakon toga askorbil-radikal podleže reakciji u kojoj dolazi do delimične regeneracije askorbata i formiranja dehidroaskorbinske kiseline (slika 1.2.) koja se, usled svoje nestabilnosti, lako razgrađuje do oksalne i L-treoninske kiseline (10). Vitamin C se veoma često upotrebljava za prezerviranje hrane, pića, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda, sam ili u kombinaciji sa sinergistima (npr. vitaminom E) (11). Međutim, nemešljiv je sa lipidima, pa je i njegova efikasnost u proizvodima koji ih sadrže

značajno umanjena. Askorbil-estri masnih kiselina su derivati prirodnih proizvoda koji zadovoljavaju sve uslove potrebne za korišćenje u takvim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. Pored toga što su efikasni liposolubilni antioksidansi, askorbil-estri masnih kiselina spadaju u jedinjenja koja sadrže i hidrofilni i hidrofobni deo u molekulu, pa mogu biti upotrebljavani kao nejonske površinski aktivne materije u deterdžentima, hrani, kozmetici, tekstilu i papiru. Ovi surfaktanti su obnovljivi i ekološki prihvatljivi, što ih čini pogodnijim za upotrebu u poređenju sa onima dobijenim iz petrohemijskih sirovina. Zbog svoje amfifilne prirode, askorbil-estri masnih kiselina u vodi formiraju nadmolekularne strukture sa lipofilnim jezgrom i hidrofilnim spoljašnjim delom, što može biti primenjeno u formulacijama nano-čestica farmaceutskih proizvoda. Lipofilni derivati askorbinske kiseline su mešljivi sa lipidima pa imaju veliki afinitet prema lipofilnim konstituentima membrana. Oni mogu biti lako adsorbovani i zadržani u lipidima u biološkim sistemima u dugom vremenskom periodu (12). Veliki je i potencijal korišćenja ovih molekula, naročito L-askorbil-estara sa dugim ugljovodoničnim lancem, u lipofilnim farmaceutskim i kozmetičkim preparatima, s obzirom na već pomenut visok afinitet prema lipofilnim konstituentima ćelijskih membrana, naročito onih na koje deluje lek (13). Neki od njih imaju kapacitet za vezivanje slobodnih radikala veći od same L-askorbinske kiseline, a pojedinicima se pripisuje i delotvornost u lečenju kancera i prevenciji bolesti izazvanih oksidativnim stresom (14).

Hemijskim putem dobijeni 6-O-askorbil-palmitat i 6-O-askorbil-stearat (E-304) se u današnje vreme koriste kao aditivi u lipofilnim proizvodima, s obzirom na svoj veliki kapacitet za vezivanje slobodnih radikala i činjenicu da su u potpunosti bezbedni za upotrebu (15). Ipak, askorbil-estri palmitinske i stearinske kiseline nisu u potpunosti rastvorni u mastima i uljima, pa se mono- i polinezasićeni acil-donori smatraju pogodnijim, s obzirom na to da njihovi askorbil-estri zbog bolje mešljivosti sa lipofilnim proizvodima pokazuju jače antioksidativno dejstvo kada se u njima primenjuju (14). Pored toga, trenutne metode za dobijanje ovih estara se zasnivaju na reakciji katalizovanoj sumpornom kiselinom koja je uglavnom neselektivna, sam postupak je zbog rada sa koncentrovanom kiselinom komplikovan, a troškovi opreme zbog njenog korozivnog dejstva su visoki. Sa druge strane, u poslednje dve decenije objavljena su brojna istraživanja u kojima je pokazano da L-askorbil-estri karboksilnih kiselina mogu biti sintetisani u regioselektivnim reakcijama katalizovanim lipazama, pod blagim reakcionim uslovima. U ovim postupcima, koji imaju karakter "zelenih" tehnologija, dobijaju se proizvodi visokog kvaliteta, a troškovi

proizvodnje su potencijalno niži. Osnovni preduslovi koji moraju biti zadovoljeni da bi enzimski postupci postali isplativi i konkurentni klasičnim hemijskim metodama jesu dobijanje maksimalnih koncentracija proizvoda uz što manju potrošnju skupih komercijalnih enzimskih preparata pod optimalnim uslovima, razvoj novih jeftinijih i/ili efikasnijih imobilisanih biokatalizatora, kao i korišćenje jeftinih sirovina kao supstrata

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ostvari doprinos razvoju efikasnog i ekonomičnog postupka za enzimsku sintezu L-askorbil-estara karboksilnih kiselina. U prvoj fazi rada će, nakon izbora najpogodnije reakcione sredine i masne kiseline kao donora acil-ostatka, biti detaljno optimizovani ključni reakcioni parametri u cilju dobijanja što viših prinosa proizvoda uz što manju potrošnju biokatalizatora. Statističko planiranje eksperimenata i analiza rezultata primenom metode odzivnih površina omogućiće uvid u pojedinačni i združeni uticaj ispitivanih faktora. Ispitivanje kinetike reakcije je preduslov za projektovanje bioreaktora, uvećanje razmera i kontrolu procesa, pa će biti utvrđen odgovarajući kinetički model kojim se dobro opisuje čitav reakcioni tok, uključujući i efekat povratne reakcije hidrolize.

Predmet istraživanja će biti i rad na razvoju imobilisanih biokatalizatora i poređenje njihove esterifikacione aktivnosti, s obzirom na to da je jedna od glavnih prepreka komercijalizaciji enzimskih postupaka sinteze askorbil-estara karboksilnih kiselina visoka cena komercijalnih preparata. Najefikasniji imobilisani preparat će nakon toga biti ispitan u dva različita reaktorska sistema – šaržnom bioreaktoru sa mešanjem i bioreaktoru sa fluidizovanim slojem biokatalizatora i recirkulacijom supstrata. Primenjene konfiguracije će biti upoređene ispitivanjem stabilnosti biokatalizatora, kinetike reakcije, kao i analizom hidrodinamičkih uslova u sistemima u cilju utvrđivanja postojanja otpora prenosu mase.

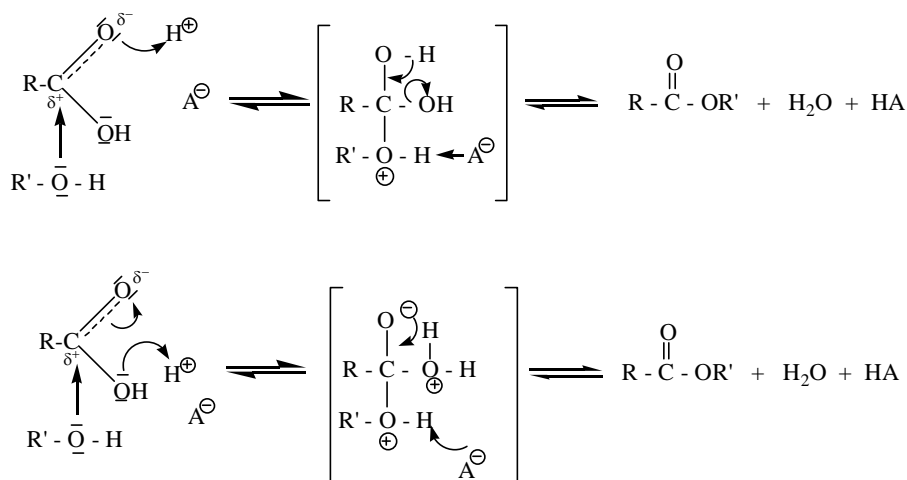
U poslednjoj fazi ispitivanja će biti analizirana mogućnost korišćenja alternativnih donora acil-ostatka radi dodatnog povećanja ekonomičnosti enzimskog procesa, s obzirom na to da su karboksilne kiseline, naročito mono- i poli-nezasićene masne kiseline dugog lanca čiji askorbil-estri predstavljaju atraktivne proizvode zbog brojnih polja potencijalne primene, veoma skupe. U tom cilju biće ispitana primena jestivih ulja i masti u transesterifikaciji sa vitaminom C, kao znatno jeftinijih i dostupnih sirovina.

2. TEORIJSKI DEO

L-askorbil-estri karboksilnih kiselina su derivati masnih kiselina i vitamina C. Oni nastaju u reakciji acilovanja, pri čemu acil-donori mogu biti različiti (masne kiseline, njihovi metil-, etil- i vinil-estri i trigliceridi), a reakcija hemijski ili enzimski katalizovana. Danas se na industrijskom nivou primenjuje isključivo hemijski postupak katalizovan koncentrovanom sumpornom kiselinom.

2.1. Hemijska sinteza L-askorbil-estara karboksilnih kiselina

U hemijskom postupku sinteze estara, katalitičko dejstvo kiseline se zasniva na povećanju pozitivnog naelektrisanja na karbonilnom ugljenikovom atomu (16). Kada se u reakcionu smešu doda kiselina atomi kiseonika iz karboksilne grupe reaguju kao baze i vezuju se koordinativno sa vodoničnim jonom, a reakcija se odvija prema jednom od dva moguća mehanizma prikazana na slici 2.1.



Slika 2.1. Mehanizam katalitičkog delovanja kiseline u sintezi estara (16).

Prvi postupci dobijanja askorbil-estara karboksilnih kiselina, opisani još sedamdesetih godina dvadesetog veka, zasnivali su se na hemijski katalizovanim procesima. 1977. godine je predstavljen postupak sinteze L-askorbil-laurata, -miristata i -palmitata katalizovan 98-99 % sumpornom kiselinom koji je optimizovan metodom odzivnih površina (17). Na temperaturi od 20 °C je nakon 36 h ostvaren prinos od 85 % pri koncentraciji vitamina C od 1,5 M i višku masnih kiselina od 36 %. Postupak je zasnovan na brzom formiranju L-askorbil-6-sulfata koji nakon toga sporo reaguje sa masnom kiselinom, dajući krajnji

proizvod. Međutim, prepreka esterifikovanju L-askorbinske kiseline u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline je njena sklonost dehidraciji u ovakvom medijumu na povišenim temperaturama. Praćenjem UV-spektra i optičke rotacije, pokazano je da na 25 °C, nakon inicijalnog pada od 5 %, struktura vitamina C ostaje nepromenjena u toku 46 dana. Analizirana je i selektivnost reakcije. Kao i ostali polioli, L-askorbinska kiselina u koncentrovanoj sumpornoj kiselini podleže različitim reakcijama, uključujući protonovanje, sulfonovanje, racemizaciju, eliminaciju (dehidraciju) i polimerizaciju. Primarni alkoholi znatno brže reaguju u reakciji sulfonovanja u poređenju sa sekundarnim alkoholima, i to 3 do 10 puta. Kao dominantan proizvod reakcije između vitamina C i sumporne kiseline nastaje 6-sulfat, dok u manjem procentu (ispod 10 %) dolazi do vezivanja za peti C atom L-askorbinske kiseline, a autori ne isključuju ni mogućnost formiranja 5,6-disulfata. Do sulfonovanja na drugom C atomu nije došlo. Rezultati su ukazali na visoku selektivnost ka 6-acilovanju u jakim kiselinama, dok -OH grupe na prvom, drugom i trećem C atomu nisu esterifikovane, najverovatnije zbog blizine ili učestvovanja u održavanju hidroksialil strukture. Čak je potvrđeno i da L-askorbil 2-palmitat rastvoren u 95-98 % sumpornoj kiselini u potpunosti prelazi u termodinamički stabilniji L-askorbil-6-palmitat. Nadalje, činjenica da je došlo do formiranja disulfata samo u tragovima ukazuje da se sulfonovanjem bilo 5-OH ili 6-OH grupe smanjuje reaktivnost susedne, neizreagovale grupe. Još ranije su u postupku zasnovanom na katalizi 95 % sumpornom kiselinom, primeni vitamina C u višku i alifatičnih kiselina dugog lanca kao donora acil-ostatka takođe sintetisani askorbil-estri (18). U ovakvom postupku je izdvajanje vitamina C teško, a s obzirom na niske prinose u odnosu na utrošeni vitamin C, ovaj proces nema industrijski značaj. Bolji prinosi su postignuti kada je reakcija izvođena u 98-99 % sumpornoj kiselini i primenom masne kiseline u višku, kao i uz održavanje koncentracije reaktanata u određenom opsegu koncentracija (19). Međutim, i u slučaju korišćenja acil-donora u višku postoje određeni problemi s obzirom na to da su masne kiseline sklone formiranju emulzija što otežava rad. Askorbil-estre nije moguće jednostavno odvojiti filtracijom, već moraju biti ekstrahovani iz reakcione smeše korišćenjem organskih rastvarača (npr. etara) i to u količinama 20-30 puta većim od inicijalne zapremine sumporne kiseline. Takođe je neophodno pažljivo ispiranje natrijum-hloridom u cilju izbegavanja formiranja emulzije. Korišćenjem anhidrovanog fluorovodonika i radom na višim temperaturama (90-120 °C) postignuti su visoki prinosi, ali nijedan od ova dva postupka nije bio prilagođen industrijskim uslovima s obzirom na poteškoće u radu sa anhidrovanim HF i formiranje složene smeše proizvoda na visokim

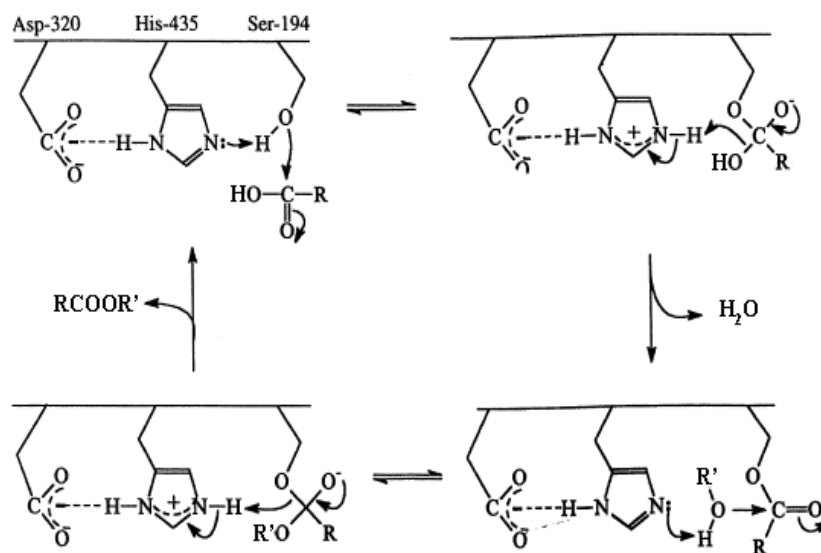
temperaturama (20). Korišćenjem sumporne kiseline ($\geq 96\%$) i metil- i etil-estara masnih kiselina (12 do 18 C atoma) u ekvimolarnom odnosu prema vitaminu C na 20 do 50 °C nakon 10 do 25 h reagovanja, ostvareni su prinosi približni onima sa viškom masne kiseline od 36 % (20). Estri mogu biti izdvojeni izlivanjem reakcione smeše na ledenu vodu pri čemu dolazi do njihove kristalizacije i tada mogu biti odvojeni filtriranjem. Sa druge strane, ekstrakcija koja uključuje i destilaciju ekstrakata i neophodan je korak u konvencionalnim procesima, a spada u skupe procedure, u ovom slučaju je izbegnuta. Nakon sušenja, ostatak nakon filtracije može biti rekristalisan iz pogodnog rastvarača. Pogodno je raditi sa koncentracijama reaktanata koje odgovaraju njihovom zajedničkom molarnom odnosu prema sumpornoj kiselini od 0,1-0,3, najbolje 0,15-0,17 na sobnoj temperaturi zbog ograničene rastvorljivosti. S obzirom na to da je rastvorljivost alkil-estara (metil- i etil-) masnih kiselina u sumpornoj kiselini veća od rastvorljivosti odgovarajućih kiselina, moguće je u ovom slučaju raditi sa višim koncentracijama L-askorbinske kiseline. Tako su dobijene konverzije od 85 % pri ekvimolarnom odnosu supstrata (koncentracija vitamina C i palmitata od 1,3 M), a moguće je koncentraciju povećavati do 2 M, čime se smanjuje količina potrebne sumporne kiseline

I pored toga što reakcija hemijski katalizovane sinteze askorbil-estara karboksilnih kiselina nije regioselektivna, postižu se niski prinosi, što otežava prečišćavanje proizvoda, a dolazi i do degradacije vitamina C (21), danas se na industrijskom nivou askorbil-estri masnih kiselina (palmitinske, laurinske i stearinske) uglavnom proizvode na ovaj način. Nasuprot tome, upotreba lipaza kao katalizatora omogućava primenu znatno blažih reakcionih uslova, daje viši prinos (visoka hemijska, regio- i stereospecifičnost) proizvoda boljeg kvaliteta, a troškovi proizvodnje su potencijalno niži.

2.2. Lipaze u sintezi askorbil-estara karboksilnih kiselina

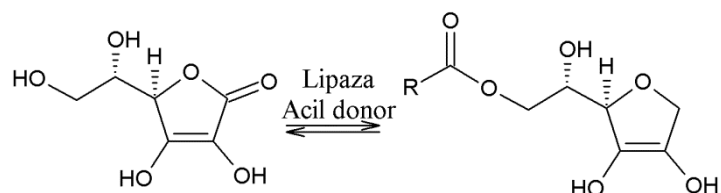
Lipaze (triacilglicerol-acil hidrolaze, E.C. 3.1.1.3.) su enzimi čija je primarna funkcija katalizovanje hidrolize triacilglicerola do slobodnih masnih kiselina, di- i monoacilglicerola i glicerola. S obzirom na to da nisu usko specifične, lipaze katalizuju i hidrolizu mnogih drugih estara. Pored toga, u sredinama sa niskom aktivnošću vode, ovi enzimi se mogu primenjivati i u reakcijama esterifikacije i transesterifikacije.

Mehanizam delovanja lipaza zasniva se na aktivaciji na granici hidrofilne i hidrofobne faze (16). Većina lipaza poseduje peptidni lanac koji u vodenim medijumima zaklanja aktivni centar enzima igrajući ulogu poklopcu, pri čemu je ovakava, “zatvorena” konformacija stabilizovana interakcijama polarnih grupa iz lanca sa molekulima vode i hidrofobnim interakcijama nepolarnih grupa sa nepolarnim aminokiselinskim ostacima iz aktivnog centra. Porast koncentracije hidrofobne supstance u mikrookolini lipaze i formiranje granice faza indukuju difundovanje molekula vode od enzima “povlačeći” za sobom poklopac zbog interakcija sa hidrofilnim delom peptidnog lanca. Novonastala, “otvorena” konformacija, dodatno je stabilizovana hidrofobnim interakcijama između nepolarnog medijuma i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka koji više nisu zaklonjeni poklopcem. Tada su ostvareni uslovi za vezivanje supstrata za ostatak serina koji sa asparaginskom kiselinom i histidinom čini takozvanu katalitičku trijadu aktivnog centra, karakterističnu za većinu lipaza.



Slika 2.2. Mehanizam odvijanja reakcije katalizovane lipazom (16).

Reakcije katalizovane lipazama se odvijaju u dva stupnja (slika 2.2.). U prvoj fazi se masna kiselina vezuje za enzim stvarajući acil-enzim kompleks uz oslobađanje vode. U drugom stupnju alkohol se vezuje za acil-enzim kompleks i formira se estar, nakon čijeg oslobađanja druga masna kiselina može da se veže za enzim. U zavisnosti od dužine lanca, broja i pozicije dvostrukih veza, vrste i broja supstituenata supstrata, afinitet lipaze prema određenom supstratu može biti različit (16).



Slika 2.3. Reakcija sinteze askorbil-estara masnih kiselina katalizovana lipazama.

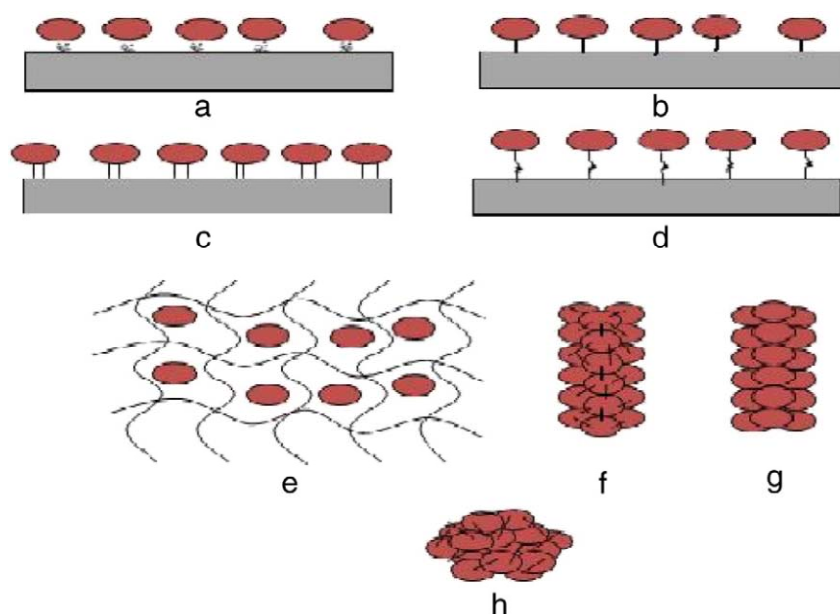
U narednom poglavlju će detaljnije biti predstavljene lipaze koje su najčešće korišćene kao katalizatori za dobijanje L-askorbil-estara karboksilnih kiselina (slika 2.3.) kao i metode primenjivane za njihovu imobilizaciju, a zatim će biti dat pregled literaturnih radova u kojima je ispitivan uticaj različitih reakcionih faktora na ovu reakciju.

2.2.1. Imobilizacija lipaza

Imobilizacija predstavlja “zadržavanje” enzima tj. ograničavanje njegovog kretanja u različitim matricama i po prvi put je primenjena u cilju recikliranja skupih enzima i, samim tim, smanjenja troškova. Takođe, aktivnost i stabilnost enzima mogu biti povećane, a izbegnuta je i kontaminacija proizvoda proteinima (22, 23). Ukoliko je imobilizacija dobro osmišljena, povećava se i termostabilnost, kao i tolerancija prema organskim rastvaračima (24, 25). Raspoložive metode, od kojih su neke primenjivane i za imobilizaciju lipaza, predstavljene su na slici 2.4.

Fizička (nekovalentna) adsorpcija spada u najstarije i najistraženije među postojećim tehnikama imobilizacije (26). Zasniva se na međumolekulskim interakcijama grupa iz molekula enzima sa nosačem (dipol-dipol, disperzione sile, vodonične veze, hidrofobne interakcije i elektrostatičko privlačenje). Prednosti ove metode su jednostavnost, pristupačnost i niska cena nosača, kao i njihova regeneracija, visok stepen očuvanja enzimске aktivnosti i specifičnosti, izvođenje pod blagim uslovima i relativno lako prečišćavanje enzimskog preparata. Sa druge strane, mane imobilizacije adsorpcijom su teškoće pri standardizaciji i dobijanju katalizatora sa tačno definisanim karakteristikama

(interakcije na kojima se zasniva su nespecifične i nisu orijentisane), mogućnost desorpcije (u prisustvu jonskih supstanci ili drugih proteina), što za posledicu ima gubitak enzima i kontaminaciju proizvoda. S obzirom na to da lipaze imaju afinitet prema granici faza ulje/voda, njihovo hidrofobno vezivanje za organske i neorganske nosače adsorpcijom pokazalo se uspešnim u brojnim istraživanjima. Nosači neorganske prirode donekle su pogodniji za upotrebu zbog otpornosti na degradaciju od strane mikroorganizama, veće termalne stabilnosti i niže cene.



Slika 2.4. Tehnike imobilizacije: fizička adsorpcija (a); jednostruko kovalentno vezivanje (b); višestruko kovalentno vezivanje (c); kovalentno vezivanje preko “duge nožice” (d); zarobljavanje u polimerne gelove i membrane (e); umreženi kristali enzima (f); kristali enzima (g); umreženi agregati enzima (h) (27).

Kovalentna imobilizacija enzima se zasniva na formiranju kovalentnih veza između funkcionalnih grupa na nosaču i molekulu enzima. Funkcionalne grupe enzima preko kojih se on vezuje za nosač, obično su amino-grupe lizina i arginina, karboksilne grupe asparaginske i glutaminske kiseline, hidroksilne grupe serina i treonina, kao i sulfhidrilna grupa cisteina. U ovakvom načinu vezivanja, obično se proces izvodi u dva koraka: aktivacija nosača stvaranjem reaktivnih funkcionalnih grupa na njegovoj površini i vezivanje enzima. Osnovni nedostatak ove metode je nemogućnost kvantitativne imobilizacije pod blagim uslovima. Često imobilisani enzim ima malu aktivnost, čemu je verovatno uzrok ograničena pokretljivost lanca i veća krutost molekula proteina (27). U

tom smislu, kovalentno vezivanje preko “duge nožice” obezbeđuje umereno ograničavanje promene konfiguracije enzima, dok višetačkasto vezivanje omogućava veću stabilnost enzima (27). Međutim, mogućnosti poboljšavanja performansi biokatalizatora kao što su aktivnost, selektivnost, stabilnost i pH optimum su izazvale veliko interesovanje za ovaj tip imobilizacije naročito kada je omogućeno višetačkasto kovalentno vezivanje koje može drastično povećati stabilnost enzima (28). Velika jačina veza koje se uspostavljaju između nosača i enzima u znatnoj meri rešava problem desorpcije i curenja enzima u toku reakcije. Postoji tvrdnja da je enzim imobilisan u organskom rastvaraču moguće koristiti u organskim medijumima, ali da ukoliko se imobilizacija izvodi u vodenoj sredini, i pored velike hidrolitičke aktivnosti, enzim nije aktivan u reakcijama koje se izvode u organskim medijumima (29). Povećana aktivnost lipaze može biti postignuta kombinacijom fizičke adsorpcije na hidrofobne nosače i višetačkastog kovalentnog vezivanja korišćenjem glutaraldehida (30). Mogućnost višekratne upotrebe kovalentno imobilisanih enzima koja doprinosi snižavanju troškova, donekle kompenzuje gubitak aktivnosti. Pored smanjenja cene procesa, povećana stabilnost i specifičnost biokatalizatora, čine kovalentnu imobilizaciju konkurentnom metodom.

Poslednjih decenija dvadesetog veka, učinjeni su veliki naponi na polju razvoja umreženih enzima, rastvorenih (cross-linked enzymes – CLE) i kristalnih (cross-linked enzyme crystals - CLEC), pogodnih za upotrebu u bezvodnim medijumima i smešama voda-organska faza zbog veće stabilnosti pod ekstremnim uslovima (31, 32). Osnovna prednost umrežavanja enzima je to što u tom slučaju nije potrebno korišćenje nosača za imobilizaciju, mogu se primenjivati neprečišćeni enzimski preparati, a koprecipitacijom sa polimerima može se podešavati mikrookruženje enzima. Kasnih devedesetih godina, utvrđeno je da se katalitički aktivni imobilisani enzimi mogu dobiti i umrežavanjem agregata (cross-linked enzyme aggregates – CLEA) (33, 34). U više radova je opisana priprema CLEA, sa ili bez nosača. Fokus nekih istraživanja bio je na upotrebi u reakcijama hidrolize (35-37), dok su se ostala bavila primenom CLEA u reakcijama sinteze estara (38-40). Pored navedenih prednosti CLEA, za enzime imobilisane bez nosača karakteristično je nekoliko bitnih nedostataka, kao što su mogućnost upotrebe uglavnom u reaktorima manjih dimenzija i veoma komplikovano optimizovanje uslova agregacije, kristalizacije i umrežavanja, što ih čini znatno manje atraktivnim za upotrebu u industrijskim bioprocima. Dodatno, male dimenzije i loša mehanička stabilnost čine otežanim njihovu upotrebu u reaktorima u kojima se odvijaju heterogene i čvrsto-čvrsto reakcije, a nije moguća ni laka separacija (41).

Nosači za koje se vezuju enzimi mogu služiti za ciljanu modifikaciju karakteristika biokatalizatora (katalitičkih i nekatalitičkih) izborom pogodnog nosača, načina vezivanja i imobilizacione tehnike, što je u slučaju odsustva nosača nemoguće. Nekoliko autora je potvrdilo da je frekvencija izmene supstrata umreženih enzima u organskim rastvaračima niža u odnosu na enzime vezane za čvrste nosače, sa istom masom proteina i pod istim reakcionim uslovima, ukazujući na to da su nefleksibilnost tj. zatvaranje molekula enzima u kompaktne kristalne rešetke i difuzione limitacije osnovni uzrok niže aktivnosti (27). Stoga bi se u budućim istraživanjima trebalo fokusirati na razvoj novih tehnika koje kombinuju prednosti metoda sa nosačem i bez njega.

Sveobuhvatan pregled različitih imobilizacionih tehnika, sa akcentom na metode imobilizacije lipaze iz kvasca *Candida rugosa* već je bio predmet nekoliko doktorskih disertacija izrađenih na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju (16, 42), pa će u daljem tekstu biti u kraćim crtama prikazane karakteristike i neke od primenjivanih metoda imobilizacije onih lipaza koje se uobičajeno koriste u sintezi askorbil-estara karboksilnih kiselina.

Sinteza L-askorbil-estara karboksilnih kiselina može se odigravati samo u medijumima sa niskom aktivnošću vode tako da nije moguća upotreba tečnih enzimskih preparata, već se moraju koristiti upravo imobilisane ili liofilizovane forme. Lipaze koje su do sada uspešno primenjene nisu brojne. U objavljenim istraživanjima su korišćene mikrobne lipaze sledećih producenata: *Candida antarctica*, lipaza B (43-46) i A (47), *Rhizomucor miebei* (48, 49), *Thermomyces lanuginosus* (50-52), *Bacillus stearothermophilus* SB-1 (53), *Burkholderia multivorans* (54) i *Burkholderia cepacia* RGP-10 (47, 55). Uglavnom su upotrebljavani komercijalni imobilisani preparati (Novozym[®], Chirazyme[®] i Lipozyme[®]), dok su u samo nekoliko studija primenjene tehnike imobilizacije u cilju dobijanja jeftinijih i/ili efikasnijih biokatalizatora. S obzirom na to da su njihove komercijalne imobilisane forme dostupne na tržištu, kao i da su se pokazali efikasnim u dosadašnjim publikacijama, tri lipaze koje se najčešće koriste za sintezu L-askorbil-estara karboksilnih kiselina su lipaza iz *C. antarctica* tipa B (CAL B), lipaza producenta *R. miebei* (RML) i lipaza iz *T. lanuginosus* (TLL), pa će o njihovim karakteristikama i primenjivanim tehnikama za njihovu imobilizaciju biti više reči u narednom poglavlju.

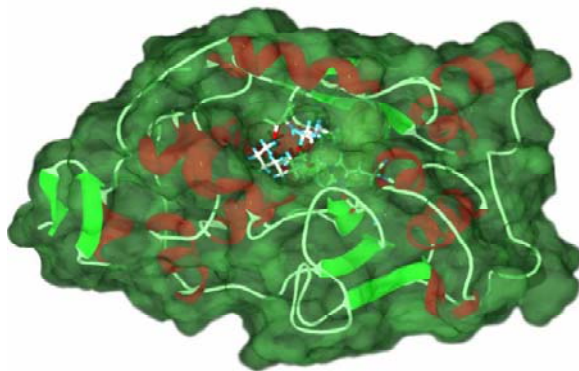
2.2.2. Lipaze koje se primenjuju u sintezi askorbil-estara

2.2.2.1. Lipaza B iz *Candida antarctica*

2.2.2.1.1. Karakteristike lipaze tipa B iz *C. antarctica*

Kvasac *C. antarctica* je producent dva izoenzima, lipaze A (CAL A) i lipaze B (CAL B) (16). Oni su drugačiji po strukturi, katalitičkoj aktivnosti i ponašanju na granici faza, a osnovna razlika je to što, kao i većina lipaza, izoenzim A podleže aktivaciji na granici faza, dok kod izoenzima B ne dolazi do ove aktivacije, i u vodenim medijumima je sličniji esterazama nego lipazama. U istraživanjima posvećenim biosintezi askorbil-estara masnih kiselina se gotovo i ne pominje upotreba CAL A, ali je zato najveći broj studija izvođen sa izoenzimom B istog producenta kao biokatalizatorom.

Lipaza tipa B producenta *C. antarctica* je biokatalizator poznat po velikoj efikasnosti i specifičnosti čija je industrijska upotreba veoma raširena – hidrolize u vodenoj sredini, esterifikacije i transesterifikacije u organskim rastvaračima, enantio- i regioselektivne transformacije polimernih i supstrata male molarne mase (27, 56). CAL B, u poređenju sa drugim lipazama, nije efikasna u hidrolizi triglicerida, ali pokazuje izuzetnu stereospecifičnost prema hidrolizi i sintezi estara, čemu je najverovatnije uzrok limitiran prostor u njenom “hidrofobnom džepu”. Značajna je i u sintezi glikolipida (57, 58).



Slika 2.5. Trodimenzionalna struktura CAL B (crvena boja predstavlja α -helikse, svetlo zelena β -naborane listove, a tamno zelenom bojom je prikazana površina molekula lipaze) (16).

CAL B je monomer molekulske mase 33,273 kDa i dimenzija $3 \times 4 \times 5$ nm, sastavljen iz 317 aminokiselinskih ostataka (40,1 % valina, leucina, izoleucina, glicina i alanina; 18,3 % treonina; 15,8 % asparaginske i glutaminske kiseline, asparagina i glutamina; 9,46 % prolina; 7,6 % triptofana, tirozina i fenilalnina; 5,6 % arginina, lizina i histidina; 3,15 % cisteina i

metionina), čija je izoelektrična tačka $pH=6$ (59). Pripada klasi α/β -hidrolaza čiji je centralni deo sastavljen iz β -naboranih listova okruženih strukturama amfifilnih α -heliksa (60, 61). Trodimenzionalna struktura CAL B prikazana je na slici 2.5.

Katalitička trijada CAL B sastoji se iz serina u položaju 105, histidina u položaju 224 i asparaginske (ili glutaminske) kiseline u položaju 187 i smeštena je u otvor oblika levka širine $1 \times 0,4$ nm i dubine 1,2 nm. Dno levka je hidrofilne prirode (serin u položaju 105 i asparaginska kiselina u položaju 134) i predstavlja mesto vezivanja karboksilne grupe. Okružuje ga region manje hidrofilitnosti (dva ostatka treonina u položajima 40 i 138 i po jedan glicin u položaju 157, izoleucin u položaju 189 i valin u položaju 190). Deo u kome se otvor sužava je hidrofobne prirode (dva ostatka valina u položajima 49 i 154 i po jedan ostatak leucina u položaju 144 i izoleucina u položaju 285 i pri formiranju kompleksa u ovom delu se pozicionira C_7 - C_{13} deo molekula donora acil-grupe, pri čemu se C_{13} atom postavlja na mesto maksimalnog suženja (16, 60). S tim u skladu su i rezultati nekoliko istraživanja koji ukazuju na pad afiniteta lipaze prema masnim kiselinama koje sadrže preko 14 C atoma. U aktivnom centru se, pored “džepa” za vezivanje acil-grupe, nalaze i mali i veliki segmenti mesta za koje se vezuju sekundarni alkoholi. Ovaj deo aktivnog centra naziva se “stereospecifični džep”, i odgovoran je za enantioselektivnost CAL B prema hirlnim sekundarnim alkoholima (62). Za razliku od većine lipaza, na ulazu do aktivnog mesta CAL B nema prepreka, pa ovaj izoenzim ne podleže aktivaciji na granici faza (63).

Katalitički ciklus CAL B započinje reverzibilnim vezivanjem prvog supstrata (donora acil-ostatka) za enzim uz formiranje tzv. Mihaelis-Mentenovog (Michaelis-Menten) kompleksa. Kada se supstrat pravilno pozicionira odigrava se nukleofilni napad serina u položaju 105 na karbonilnu grupu supstrata što dovodi do formiranja prvog tetraedarskog intermedijara. Negativno naelektrisani 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. Zatim se proton sa histidina u položaju 224 prenosi na kiseonik, a formirani molekul vode napušta aktivni centar. Na kraju se, kao proizvod ovog stupnja, formira acil-enzim kompleks. Drugi tetraedarski intermedijar nastaje napadom nukleofila (alkohola) na acil-enzim kompleks. Najpre se proton sa nukleofila prenosi na histidin u položaju 224, pri čemu nastaje alkoksidni anjon. Ovaj anjon zatim napada karbonilni ugljenikov atom, što vodi nastajanju drugog tetraedarnog intermedijarnog oksianjona (takođe stabilisan vodoničnim vezama). Nakon toga, proton sa histidina u položaju 224 prelazi na alkil-kiseonik serina u položaju

105. Tada se formira estarska veza u supstratu i nastaje labavo vezan enzim-proizvod kompleks, iz koga se oslobađa proizvod i regeneriše slobodan enzim (16).

2.2.2.1.2. *Imobilizacija lipaze B iz C. antarctica*

Pregledom dostupne literature, ustanovljeno je da se u najvećem broju istraživanja upotrebljava Novozym[®] 435, komercijalni imobilisani enzimski preparat. Izoenzim B iz kvasca *C. antarctica* je u ovom preparatu imobilisan na makroporoznu smolu (Lewatit[®] VP OC 1600) koja predstavlja umreženi polimer metakrilata sa divinil-benzenom. Sadržaj enzima se, prema literaturi, kreće od 8,5 do 20 masenih %, pri čemu su molekuli lipaze smešteni u 50-100 µm široka područja na spoljašnjem delu kuglica (64, 65). Izuzetna katalitička efikasnost preparata Novozym[®] 435 potvrđena je u mnogim publikacijama, ali je, s obzirom na visoku cenu, njegova upotreba ograničena na dobijanje visoko-vrednih i/ili optički čistih proizvoda. Međutim, rezultati do kojih je, radeći sa preparatom Novozym[®] 435, došao Čen (Chen) sa saradnicima ukazuju na mogućnost fizičke desorpcije i “curenja” enzima u toku reakcije (64). Takođe je utvrđeno da se nakon inkubacije Novozym[®]-a u organskim rastvaračima i jonskim tečnostima, u uslovima sličnim reakcionim, mogu detektovati određene supstance, među kojima se nalazi i nekoliko jedinjenja koja su reaktivna u prisustvu CAL B (glicerol, benzoeva kiselina, 2-hidroksi-etil-benzoat, 2-hidroksi-etil-sorbat i sorbinska kiselina), pri čemu poslednja četiri mogu biti i donori acil-grupe u enzimskim transesterifikacijama (66). U nekim aplikacijama kao što je medicinska, kontaminacija proizvoda proteinima nije dopustiva, a intenzivno “curenje” lipaze bi ograničilo broj ponovljenih ciklusa u kojima je enzim moguće koristiti i učinilo proces manje isplativim. Stoga je rad na razvijanju adekvatnih imobilizacionih metoda od velikog značaja, jer poboljšanje karakteristika enzima kao što su stabilnost, aktivnost, specifičnost, selektivnost i smanjenje inhibicije, omogućava njegovu mnogo širu industrijsku primenu. Brojna istraživanja usmerena su na imobilizaciju CAL B, bilo za njenu upotrebu u osnovnim istraživanjima ili u komercijalne svrhe, ali je i dalje razvoj robusne metode izazov.

Miletić je sa saradnicima uspešno imobilisao CAL B na nanočestice polistirena sintetisane nanoprecipitacijom (67). Količina lipaze koja je adsorbovana nije zavisila od pH vrednosti pri kojoj je vršena imobilizacija, ukazujući na to da su hidrofobne interakcije bile pokretačka sila procesa. Međutim, pH adsorpcije uticala je na aktivnost imobilisanog enzima – najveća aktivnost postignuta je kada je adsorpcija vršena na pH vrednosti bliskoj

izoelektričnoj tački lipaze ($pI=6$), verovatno zbog povoljne raspodele naelektrisanja na ostacima aminokiselina koja je onemogućila promenu konformacije enzima. Autori su takođe utvrdili da imobilisani enzim ima veću aktivnost ($\text{nmol } p\text{-NPP (} p\text{-nitrophenyl palmitate) min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ CAL B}$) od slobodne lipaze, kao i od Novozym[®]-a 435.

Agarozni gelovi prevučeni gustim slojem polietilenimina (PEI-agaroz) koji sadrže 1000 μmol jonizovanih grupa po gramu vlažnog nosača, mogu da adsorbuju proteine u širokom opsegu eksperimentalnih uslova (različite temperature i pH vrednosti od 5 do 9). Torres (Torres) je sa kolegama vršio adsorpciju CAL B na PEI-agarozu u širokom opsegu pH vrednosti i temperature (68). Određivana je katalitička aktivnost preparata praćenjem enantioselektivne hidrolize metil-estara *R,S*-fenil-glikolne kiseline pod uslovima pri kojima je odigravana i imobilizacija. Najbolja enantioselektivnost postignuta je sa lipazom imobilisanom na $\text{pH}=9$ i $t=4$ °C, a preparat je imao još veću aktivnost kada je reakcija izvođena pri $\text{pH}=5$ i $t=4$ °C ($E=25$). Pod istim reakcionim uslovima, postignuti su veoma slabi rezultati ($E=3,5$) kada je adsorpcija vršena na $\text{pH}=5$ i na $t=25$ °C. Autori su zaključili da isti enzim adsorbovan na isti nosač pod istim reakcionim uslovima pokazuje veoma različitu aktivnost i selektivnost u zavisnosti od primenjenih uslova u toku procesa adsorpcije. Ove rezultate su objasnili mogućnošću postojanja različitih konformacija CAL B usled intenzivne razmene anjona u više tačaka na velikoj površini enzima interakcijom sa gustim slojevima PEI-a. U drugoj studiji je utvrđeno da dodavanje amonijum-sulfata nosaču, kao i proteini kojima je enzim kontaminiran, mogu doprineti povećanju aktivnosti i/ili stabilnosti enzima (69). Pored toga, poznato je da u zavisnosti od tipa nosača, pH adsorpcije ima različit uticaj na aktivnost, stabilnost i specifičnost enzima (70, 71).

Autori koji su se bavili adsorptivnom imobilizacijom CAL B, generalno prijavljuju povećanje aktivnosti, operativne i termalne stabilnosti enzima, ali su informacije o curenju enzima koje uzrokuje kontaminaciju proizvoda i poskupljivanje procesa, po pravilu ostale nezabeležene. Veoma je značajno učiniti upotrebu CAL B u industrijskim uslovima mogućom i konkurentnom u odnosu na klasične hemijske metode, ali pri fizičkoj adsorpciji na hidrofobne nosače, imobilisani enzim može da podleže dislociranju - desorpciji uz gubitak aktivnosti.

Kovalentno vezivanje je često primenjivan tip imobilizacije CAL B (25, 72-75), a u daljem tekstu će biti navedeno samo nekoliko literaturnih primera. Čestice na bazi hitozana i kompleksa hitozana i alginata su najpre modifikovane tretiranjem sa glicidolom ili glutaraldehydom, a zatim je na njih kovalentno vezivana CAL B (75). Aktivnost dobijenih

preparata je bila nešto niža u poređenju sa Novozym[®]-om 435, a najbolji rezultat (termalna stabilnost na 60 °C i operativna stabilnost u ponovljenim ciklusima sinteze butil-oleata) ostvareni su sa nosačem na bazi hitozana i alginata aktiviranim dvoprocentnim glutaraldehydom. Preparat je posedovao 33 puta veću temperaturnu stabilnost u odnosu na slobodan enzim i nije izgubio aktivnost nakon 8 konsektivnih reakcionih ciklusa dužine 12 h. Kada je CAL B imobilisana na hitozan i agarozu, praćen je uticaj aktivirajućeg agensa (glicidol, glutaraldehyd i epihlorhidrin) i vremena imobilizacije (5, 24 i 72 h) na hidrolitičku aktivnost, termalnu stabilnost i stabilnost u alkalnoj sredini (76). Najveće aktivnosti dobijene su kada je agaroz tretirana glicidolom (845 U g⁻¹ nakon 72 h) i kada je korišćen glutaraldehyd za aktiviranje hitozana (1209 U g⁻¹) i agaroze (2716 U g⁻¹) a imobilizacija trajala 5 h. Termalne stabilnosti nabrojanih preparata bile su uvećane 20 puta, 18 puta i 21 put u odnosu na slobodan enzim, redom. Kada je hitozan aktiviran u dva stupnja korišćenjem glicidola i glutaraldehyda, a imobilizacija trajala 72 h, dobijen je enzim čak 58 puta stabilniji od slobodne forme. Povećana stabilizacija koja je ostvarena pri produženim vremenima imobilizacije ukazivala je na značaj višetačkastog kovalentnog vezivanja između lipaze i nosača. CAL B je kovalentno imobilisana na nano-čestice polistirena primenom fotoreaktivnog reagensa 1-fluoro-2-nitro-4-azido-benzena i primenjena u reakciji sinteze metil-oleata pod dejstvom mirkotalasa (77). Na optimalnoj pH imobilizacije od 6,8 je vezano 218 mg proteina po gramu nosača, dok je na pH 10 dobijen preparat veće termostabilnosti, ali više nego dva puta manje aktivnosti. U reakciji esterifikacije je imobilisani enzim nakon 15 ciklusa upotrebe zadržao 50 % od ukupne početne aktivnosti. Nekoliko komercijalno dostupnih lipaza, među kojima i CAL B, imobilisano je kao CLEA korišćenjem različitih reagenasa za precipitaciju i glutaraldehyda kao umreživača, a postignuti rezultati su praćeni u reakciji između laurinske kiseline i *n*-propanola u sistemu bez rastvarača (78). Ustanovljeno je da je uticaj upotrebljenog reagensa za precipitaciju na specifičnu i ukupnu aktivnost veliki. Najveću zadržanu aktivnost imali su CLEA sa CAL B za čije su dobijanje korišćeni PEG600, amonijum-sulfat, PEG200 i aceton, pri čemu je maksimalnu specifičnu aktivnost posedovao imobilizat za koji je upotrebljavan PEG200. Kinetičkim ispitivanjima, ustanovljeno je da se V_{max}/K_m ne menja značajno formiranjem CLEA. Druga grupa istraživača je pokazala da CAL B-CLEA ne podleže curenju enzima u vodenoj sredini, kao i da ima odlične performanse u organskim rastvaračima i nadkritičnom CO₂ (79). Kruz i saradnici su primenom metode odzivnih površina (RSM – response surface methodology) za optimizaciju i BSA (bovine serum albumin - albumina iz goveđeg

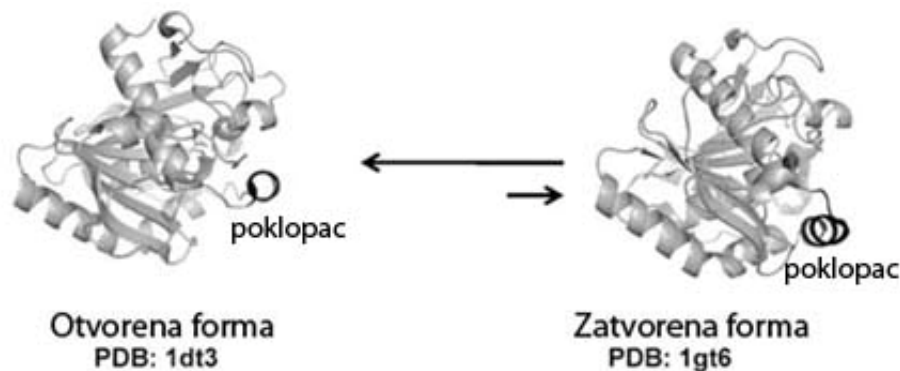
seruma) kao dodatka za koagregaciju pri formiranju CAL B-CLEA utvrdili uslove pri kojima se dobija preparat velike aktivnosti i stabilnosti (80). Proces je izvođen pod sledećim uslovima: koncentracija proteina 3 mg mL⁻¹, *t*-butanol kao agens za precipitaciju (50 %*(v/v)*, 60 min) i 1,5 %*(w/v)* glutaraldehida. Neophodnost dodavanja proteina koji ima dovoljno amino-grupa i koji omogućava lako umrežavanje sa glutaraldehydom, kao što je BSA, je objašnjena činjenicom da CAL B poseduje malu koncentraciju amino-grupa na površini s obzirom na mali broj ostataka lizina. Ista istraživačka grupa predložila je i drugi, efikasniji način za prevazilaženje ovog problema primenom hemijske aminacije CAL B korišćenjem etilendiamina i karbodiimida (81). Pre modifikacije lipaze vršena je imobilizacija njenom adsorpcijom na oktil-Sefarozu, a modifikovani desorbovani enzim je posedovao veću aktivnost od nemodifikovane forme. Ovakav preparat bio je izuzetno pogodan za umrežavanje, a njegova stabilnost u organskim rastvaračima i na visokim temperaturama bila je povećana u odnosu na CAL B-CLEA dobijen koagregacijom sa BSA.

2.2.2.2. Lipaza producenta *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

2.2.2.2.1. Karakteristike lipaze iz *T. lanuginosus*

Ovaj enzim komercijalno je dostupan u rastvornoj formi kao preparat Lipolase[®] i u imobilisanoj formi kao Lipozyme[®] TL-IM, oba od proizvođača Novozyme. Lipolase[®] je proizvedena od strane genetski modifikovanog soja *Aspergillus oryzae* (82). Za imobilisani preparat, korišćen je silikatni nosač, a vezivanje je ostvareno jonskom adsorpcijom (83).

TLL je protein sa jednostrukim lancem sastavljenim iz 269 aminokiselina, čija je molekulska masa 31,7 kDa i izoelektrična tačka 4,4 (84). Molekul enzima ima sferičan oblik, dimenzija 3,5×4,5×5 nm, i sadrži centralnu β-naboranu strukturu sastavljenu iz osam “listova” povezanih međusobno sa pet α-heliksa (85). Molekul poseduje poklopac u vidu α-heliksa čija je površina pokretna i koji se sastoji iz aminokiselina 86-93 koje zaklanjaju aktivni centar sačinjen od tipične katalitičke trijade sastava Ser-His-Asp (86). Poznato je i da se jedan od četiri ostatka triptofana (Trp89) nalazi na poklopcu i da ima značajnu ulogu u hidrolitičkoj aktivnosti lipaze. Takođe je utvđeno i da je aktivacija TLL na granici faza kontrolisana pozitivno naelektrisanim ostacima u okolini poklopca (87). Strukture “otvorene” i “zatvorene” forme TLL prikazane su na slici 2.6. TLL spada u stabilne lipaze, koje zadržavaju aktivnost i na temperaturama 55-60 °C, čemu doprinosi ostatak serina (88). Maksimum aktivnosti ovaj enzim ima na pH=9 (89).



Slika 2.6. Struktura “otvorene” i “zatvorene” forme TLL (85).

2.2.2.2. Imobilizacija lipaze iz *T. lanuginosus*

Lipaze generalno pokazuju tendenciju da formiraju bimolekularne agregate, povezujući se svojim aktivnim centrima (90). TLL spada među lipaze sa najizraženijom tendencijom ka formiranju ovih agregata, pa se druge imobilisane lipaze mogu koristiti za njeno prečišćavanje ili imobilizaciju (91). Ove činjenice se moraju uzeti u obzir kada se govori o osobinama TLL, s obzirom na to da monomer i dimer poseduju različitu aktivnost, stabilnost i selektivnost (90). Pojedini aditivi mogu imati povoljno dejstvo na neke karakteristike TLL. Betain povećava termalnu stabilnost TLL i pokazuje zaštitni efekat u smislu sprečavanja prelaza u razvijenu konformaciju guanidin hidrohloridom (92). Uticaj betaina na promene strukture TLL objašnjen je povećanjem površinskog napona vode u rastvoru, a ne direktnim interakcijama sa enzimom. Deterdženti su pokazali značajan uticaj na osobine TLL. S jedne strane, oni dovode do prekida interakcija između dva molekula enzima, dajući aktivnije, ali manje stabilne monomere (90). Sa druge strane, deterdženti stabilizuju otvorenu formu enzima (93). Oba efekta dovode do povećanja aktivnosti enzima u prisustvu umerenih koncentracija deterdženata, naročito CTAB-a (cetil-trimetilamonijum-bromid) (94). Međutim, deterdženti se takođe mogu ponašati kao inhibitori lipaza i dovoditi do njihove inaktivacije, ali takođe i uzrokovati promene specifičnosti (85). Sve ovo ukazuje na to da, ukoliko se pravilno upotrebe, deterdženti mogu biti koristan alat za poboljšanje karakteristika i performansi TLL.

Višetačkasto kovalentno vezivanje enzima za glioksilne, epoksi ili glutaraldehidne nosače odvija se preko primarnih amino-grupa (85). S obzirom na to da molekul TLL ima samo sedam ostataka lizina, uglavnom se najpre vrši hemijska aminacija modifikovanjem karboksilnih grupa etilendiaminom nakon aktivacije karbodiimidom, čime se broj primarnih amino-grupa povećava petostruko (86). Ovakav postupak omogućio je povećanje

stabilnosti enzima nekoliko stotina puta, dok je zadržana aktivnost bila na zadovoljavajućem nivou – oko 70 % (89). Druga strategija podrazumeva adsorpciju TLL na hidrofobne nosače, pri čemu se stabilizuje otvorena konformacija enzima, a katalitičke osobine postaju zavisne od prirode nosača (85). Jako hidrofobno okruženje aktivnog centra dovodi do pada aktivnosti lipaze u katalizovanju reakcija sa hidrofilnim supstratima, dok se afinitet prema supstratima hidrofobne prirode znatno povećava, što omogućava parcijalnu hidrolizu poliestara (95). Dobri rezultati postizani su u slučaju korišćenja nekoliko hidrofobnih nosača: Accurel[®]-a EP100, agaroze aktivirane različitim alkil grupama i Sepabeads[®]-a sa oktadecil grupama na površini (85). Primenjena je i metoda unakrsnog povezivanja enzima precipitacijom TLL sa (NH₄)₂SO₄ u prisustvu SDS-a (sodium dodecyl sulfate – natrijum dodecil sulfat) i umrežavanjem korišćenjem glutaraldehida, što je dovelo do trostrukog povećanja hidrolitičke aktivnosti lipaze u odnosu na nativni enzim. Sličnim postupkom, dobijen je i biokatalizator čija je aktivnost u organskim medijumima bila povećana deset puta (96). Za imobilizaciju TLL korišćeni su i takozvani “pametni polimeri” čija je rastvorljivost uslovljena uslovima sredine (85). TLL je vezivan za dva hidrosolubilna polimera – Eudragit[®] S-100 i karboksimetil celulozu (97). Primenjena je aktivacija karbodiimidom, pa su između polimera i lipaze ostvarivane kovalentne veze. U slučaju korišćenja Eudragit[®]-a, preparat (E-TLL) je imao osobine reverzibilne rastvorljivosti u vodi u zavisnosti od pH sredine, pa je tako pri pH<5 bio nerastvoran, dok je na pH>5,5 bio rastvoran. Kada je korišćen kao katalizator, postignuta je potpuna hidroliza 20 % maslinovog ulja u izooktanu. E-TLL je pokazao zadovoljavajuću stabilnost pri mešanju i nije izgubio aktivnost pri višestrukoj upotrebi u konsekutivnim reakcionim ciklusima, a njegova specifičnost prema supstratima nerastvornim u vodi 4 puta je povećana (praćena je aktivnost u reakciji hidrolize maslinovog ulja i poređena sa slobodnim enzimom). TLL vezana za karboksimetil celulozu može biti reverzibilno istaložena iz vodenog rastvora korišćenjem 7 %(w/w) PEG-a 4000 u kombinaciji sa Ca²⁺ jonima (50 mM), a dobijeni preparat ima povećanu specifičnost prema hidrosolubilnim supstratima (preko 4 puta je povećana brzina reakcije hidrolize *p*-nitrofenil-acetata u odnosu na nativni enzim).

Objavljeni su i rezultati nekih istraživanja posvećenih imobilizaciji TLL na nanočestice. Prednosti korišćenja ovakvih nosača su smanjenje difuzionih limitacija i mogućnost upotrebe sa čvrstim supstratima (98). Međutim, enzim je u ovom slučaju na površini nosača, izložen spoljašnjim uticajima, što otvara mogućnost inaktivacije zbog autoproteolize, interakcije sa mehurovima gasa ili kapljicama rastvarača (85). To bi moglo

biti sprečeno obavijanjem hidrofilnim polimerom, što sprečava direktan kontakt između imobilisanog enzima i bilo kog drugog makromolekula ili površine (99). Ispitana je i mogućnost reaktivacije nekih imobilisanih preparata TLL inaktiviranih pod dejstvom visokih temperatura ili organskih rastvarača. Pokazano je da inkubacijom pod blagim uslovima (bez organskog rastvarača na 25 °C) aktivnost delimično inaktivirane kovalentno imobilisane TLL (naročito ukoliko je uzrok inaktivacije bila interakcija sa organskim rastvaračem), može u visokom procentu biti povraćena (100). Kod višetačkastog kovalentnog vezivanja TLL preko amino-grupa, aktivnost se može vratiti na 100 % početne ukoliko se određuje u prisutvu CTAB-a, što ukazuje na to da je ovakav način imobilizacije enzima omogućio ne samo povećanje stabilnosti, već i olakšanu reaktivaciju inaktiviranog preparata regeneracijom mehanizma formiranja otvorene i zatvorene konformacije lipaze zaduženog za njeno katalitičko delovanje (101). Jedna od primenjenih strategija je i modifikovanje površine imobilizata polimerima velike hidrofilnosti, pri čemu je osnovna hipoteza bila da, usled sternih smetnji, grupe vezane za polimer najverovatnije neće menjati položaj tokom razvijanja i ponovnog uvijanja (102). Hidrofilna priroda polimera uticaće na raspodelu pojedinih aminokiselinskih ostataka proteina, pa će tako hidrofilne grupe biti uglavnom raspoređene po površini molekula, dok će hidrofobne grupe ostati u jezgru. Na ovaj način enzim je vratio svoju aktivnost na nivo početne i to bez prisustva CTAB-a. Tretiranjem inaktiviranog enzima guanidinom kao haotropnim agensom nije se došlo do zadovoljavajućeg stepena reaktivacije (85).

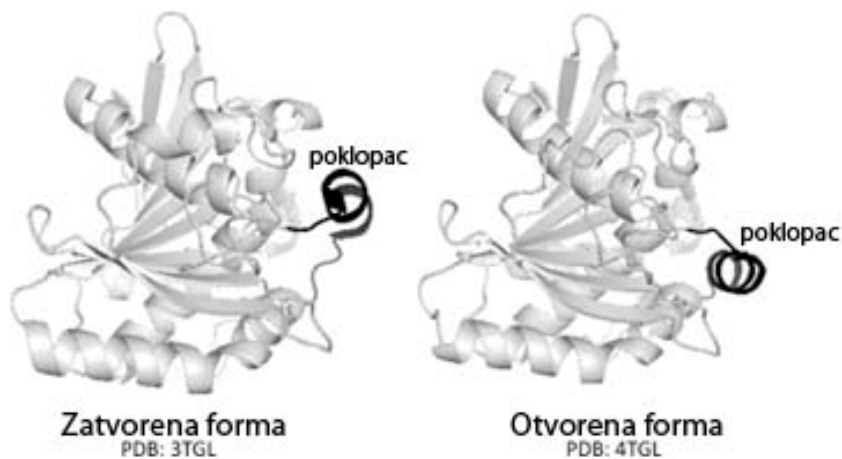
2.2.2.3. Lipaza producenta *Rhizomucor miehei* (RML)

2.2.2.3.1. Karakteristike lipaze iz *R. miehei*

Ovaj ekstracelularan enzim, prvi put je okarakterisan 1973. godine i opisana je njegova upotreba u prehrambenoj industriji za transformacije hrane (103). Već tada je dokazano da je specifičnost ove lipaze prema supstratu snažno uslovljena pH vrednošću sredine, tako da su pri niskim pH medijuma, masne kiseline kratkog lanca bile pogodnije za hidrolizu. Nativni enzim javlja se u dve forme koje se međusobno razlikuju po stepenu deglikozilacije (izoenzim B nastaje parcijalnom deglikozilacijom izoenzima A) (104). Kasnije je, ekspresijom odgovarajućih gena, ovaj enzim produkovan od strane *Aspergillus oryzae* (105). Komercijalno su dostupne i slobodna (Palatase® 2000L) i imobilisana forma (Lipozyme® RM-IM), obe proizvođača Novozyme. RML je u preparatu Lipozyme® imobilisana na

nosač Duolite® ES 562, slabu jonoizmenjivačku smolu na bazi fenol-formaldehid kopolimera (104, 106, 107). Neka od prvih istraživanja sprovedenih sa ovom imobilisanom formom ukazuju na značajan uticaj vezivanja lipaze za nosač na njenu specifičnost prema različitim masnim kiselinama (106).

Veličina molekula RML je 31,6 kDa, a izoelektrična tačka 3,8 (108). Katalitička trijada se sastoji iz tri aminokiselinska ostatka – Ser, His i Asp, pri čemu je aktivni serin zaklonjen ispod kratkog helikoidnog fragmenta duguljastog poklopca. Enzim je opisan kao jednostruki polipeptidni lanac sastavljen iz 269 aminokiselinskih ostataka. Ovaj segment je preklopljen jednostrukim β -naboranim listom pretežno sastavljenim iz paralelnih lanaca povezanih različitim “ukosnicama”, petljama i spiralnim delovima (109). Sve petlje su usmerene u desnu stranu, tako da je centralni list asimetričan i svi vezujući fragmenti su locirani na jednoj strani. Jednostruki *N*-terminalni α -heliks obezbeđuje potporu za suprotan kraj β -ploče. Molekul je stabilizovan sa tri disulfidna mosta (između ostataka 29 i 268, 40 i 43, 235 i 244) (103).



Slika 2.7. Struktura “otvorene” i “zatvorene” forme RML (103).

Pokretanje poklopca sastavljenog iz 15 aminokiselinskih ostataka (82-96) se odvija po principu pokretanja čvrstog tela preko “šarke” (kratak α -heliks ostataka 85 do 91), a rezultat tog procesa je da hidrofobni deo molekula (oko 8 % ukupne spoljašnje površine) postaje izložen na površini (103). Simulacije promena strukture usled pomeranja poklopca koji zaklanja aktivni centar pokazale su da, između ostalog, Arg86 u petlji stabilizuje otvorenu konformaciju proteina višestrukim vezivanjem vodoničnim vezama za površinu enzima (110). Ovaj ostatak ima ključnu ulogu u aktiviranju lipaze na granici faza. Strukture “otvorene” i “zatvorene” forme RML prikazane su na slici 2.7.

Stabilnost RML pod različitim uslovima kao što su temperatura i pritisak, takođe je ispitivana. Pokazano je da pod pritiskom koji ne dovodi do denaturacije enzima održavanje stalnog pritiska štiti RML od termalne deaktivacije, što može biti od značaja pri upotrebi u nadkritičnim fluidima (111). Pod pritiskom koji denaturiše enzim, stabilizacija se može obezbediti delovanjem poliola (112). RML spada u lipaze koje pokazuju visoku aktivnost u medijumima sa niskom aktivnošću vode, pa se mogu upotrebljavati i kao katalizatori reakcija koje se odvijaju u organskim rastvaračima.

2.2.2.3.2. *Imobilizacija lipaze iz R. miehei*

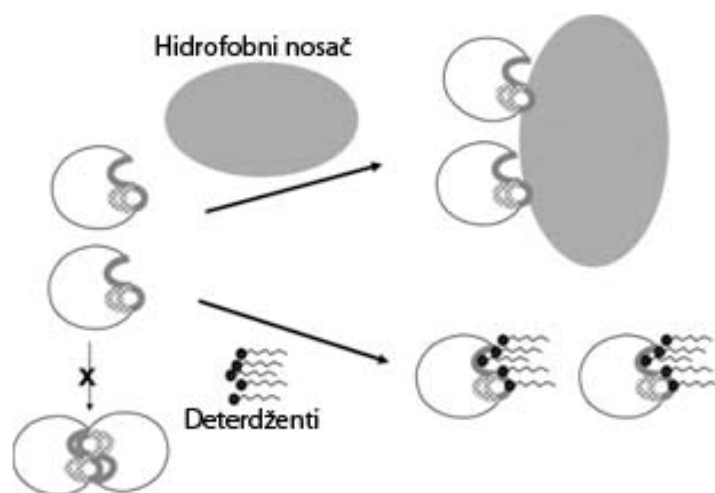
U više studija prijavljena je uspešna imobilizacija, hiperaktivacija, pa i prečišćavanje RML vezivanjem za hidrofobne nosače ili nosače sa uvedenim hidrofilnim grupama (113-116). Tri različite površine (jedna izrazito hidrofobna, druga hidrofobna sa uvedenim karboksilnim grupama i treća hidrofilna sa hidroksilnim grupama) testirane su kao nosači za vezivanje RML u cilju utvrđivanja uticaja nosača na afinitet prema hidrolizi ili sintezi estara kao i prema supstratima (116). Lipaza koja je bila vezana za hidrofilnu površinu prevashodno je katalizovala reakciju hidrolize monokaprinata do glicerola i kaprinske kiseline. Lipaza adsorbovana na hidrofobni nosač, a naročito RML kovalentno vezana za hidrofobnu površinu posredstvom karboksilnih grupa, favorizovala je reakciju sinteze dikaprinata iz monokaprinata u odnosu na njegovu hidrolizu, a detektovane su i male količine trikaprinata. Kada su Petkar i sar. imobilisali lipaze nekoliko producenata, među kojima i RML na nekoliko hidrofilnih nosača sa rastućom hidrofobnošću bočnih grupa (Sepabeads[®] EC-butil, -oktil, -decil i -oktadecil) i dva porozna hidrofobna nosača na bazi stiren-divinilbenzena (Diaion[®] HP20 i Diaion[®] SP207) maksimalna esterifikaciona aktivnost u reakciji sinteze butil-oleata iz *n*-butanola i oleinske kiseline ostvarena je kada je korišćena RML vezana za oktadecil-Sepabeads[®] (115). Aktivnost RML je bila veća nego aktivnost drugih imobilisanih lipaza (CAL B i TLL) i jedina je bila bliska rezultatima ostvarenim sa komercijalnim preparatom Novozym[®] 435.

Često je za imobilizaciju RML korišćena i kovalentna imobilizacija (117-120). Primenjivana je tehnika imobilizacije RML sa uvedenim tiolnim grupama na heterofunkcionalne epoksi-disulfidne nosače, što je omogućilo istovremenu specifičnu imobilizaciju proteina preko tiolnih grupa i stabilizaciju višetačkastim kovalentnim vezivanjem (12-15 puta veća stabilnost nego u slučaju vezivanja samo preko tiolnih grupa) (119). Kada je za kovalentnu imobilizaciju RML korišćen kopolimer na bazi polietilena sa bočnim lancima

poli(hidroksietilmetakrilata), parcijalno hidrolizovanim u cilju podešavanja hidrofobnosti, esterifikaciona aktivnost u reakciji sinteze oktil-oleata je bila petostruko povećana u odnosu na slobodan enzim (120). Svojstvima kopolimera su pripisana poboljšanja kao što su povećanje specifične aktivnosti, efekat prečišćavanja, povećana operativna stabilnost i stabilnost u toku čuvanja. RML je uspešno imobilisana i kovalentnim vezivanjem za namagnetisane nano-čestice polisiloksan-polivinil-alkohola i primenjena u sintezi aroma-estara u *n*-heptanu i hidrolizi maslinovog ulja (103). Stabilnost i aktivnost pod neoptimalnim uslovima (pH i temperatura) bili su uvećani u odnosu na slobodan enzim.

Imobilizacija RML primenom tehnike formiranja CLEA-a je takođe primenjivana. Kada je precipitacija vršena korišćenjem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u prisustvu SDS-a, nakon čega je vršeno umrežavanje glutaraldehidom, dobijen je preparat čija je hidrolitička aktivnost bila dvostruko veća u odnosu na rastvorenu formu, dok je aktivnost u organskim medijumima bila povećana čak deset puta (96). Primenjivane su i tehnike obuhvatanja enzima nosačem inkapsulacijom u organogelove hidroksi(propilmetil)-celuloze, želatina ili agara sa mikroemulzijama lecitina ili dioktil-natrijum-sulfosukcinata, a dobijeni preparati su uspešno primenjivani kao katalizatori u reakcijama esterifikacije (121-124).

Pojedini aditivi mogu biti korišćeni u cilju promena osobina RML. Neki deterdženti (natrijum-holat, Tween[®] 80, Tween[®] 20) mogu biti primenjeni kao aktivatori ove lipaze, povećavajući njenu aktivnost u organskim rastvaračima 2-2,5 puta (103). Nasuprot tome, nejonski deterdžent – Brij[®] 58 i katjonski – CTAB, delovali su inhibitorno.



Slika 2.8. Različite metode razdvajanja dimera RML na monomere (103).

U studiji u kojoj je korišćen amfoterni surfaktant natrijum-N-(2-hidroksidodecil)-sarkozinat, čije se naelektrisanje može kontrolisati promenom pH, dokazano je da se enzim

vezuje na površinu surfaktanta samo ukoliko je “glava” pozitivno naelektrisana (103). Ispostavilo se da broj molekula surfaktanta koji se vezuju za jedan molekul enzima zavisi od strukture površinski aktivne materije, kao i da se ispod kritične micelarne koncentracije (CMC – critical micellar concentration) deterdženta vezivanje odvija između negativno naelektrisanih ostataka na površini enzima i pozitivno naelektrisanih “glava” PAM (površinski aktivna materija), pri čemu je adsorpcija donekle pospešena i podrazumeva interakcije hidrofobnih delova molekula enzima u neposrednoj blizini negativno naelektrisanih regiona i “repova” katjonskog surfaktanta. Druga grupa autora je ustanovila da interakcije RML sa katjonskim surfaktantima umanjuju aktivnost enzima u reakciji hidrolize palminog ulja, pa su preporučili upotrebu nejonskih i anjonskih PAM sa glomaznim hidrofobnim “repovima” u reakcijama koje se odvijaju u sistemima tipa mikroemulzija (103). RML je sklona formiranju dimera smanjene aktivnosti koji u prisustvu deterdženata mogu biti razgrađeni do monomernih jedinica, pa i ovaj efekat korišćenja površinski aktivnih materija treba biti uzet u obzir (103). Razdvajanje dimera RML na monomere primenom hidrofobnih nosača i deterdženata prikazano je na slici 2.8.

2.2.3. Uticaj reakcionih faktora na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

U narednom poglavlju će biti predstavljeni rezultati dosadašnjih istraživanja posvećenih optimizaciji ključnih reakcionih parametara u sintezi L-askorbil-estara karboksilnih kiselina katalizovanim lipazama. U tabeli 2.1. je dat pregled nekih karakterističnih primera sa vrednostima parametara i ostvarenim rezultatima, dok će u daljem tekstu biti izložena detaljnija analiza uticaja pojedinih reakcionih faktora na efikasnost enzimske sinteze estara.

Tabela 2.1. Pregled uslova primenjivanih za enzimsku sintezu L-askorbil-estara karboksilnih kiselina.

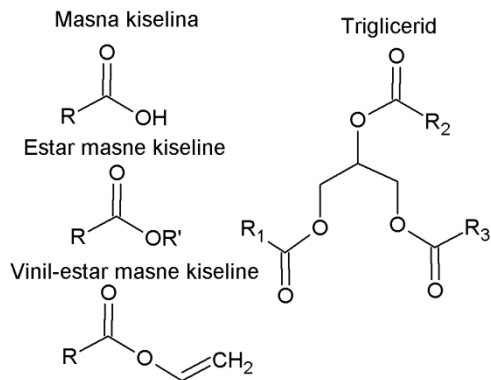
Lipaza	Acil-donor	Reakcioni medijum	Reakcioni uslovi	Prinos proizvoda	Ref.
Novozym® 435 Lipozyme® RM-IM	laurinska, miristinska, palmitinska, stearinska kiselina	2-metil-2-pentanol	0,15 mmol AK, 0,9 mmol AD, 5 mL medijuma, 150 mg lipaze, 45 °C, 24 h	≤ 65 %	(49)
Chirazyme® L-2	kaprinska, laurinska, miristinska, oleinska, linolna, arahidonska kiselina	acetone	40 g AK, 0,2 M AD, 1,5 g lipaze, 50 °C, 1-2 dana, pakovani sloj, (0,5 mL min ⁻¹), 5 min vreme zadržavanja	1,6-1,9 kg L ⁻¹ reaktora i danu	(44)
Lipaza iz <i>Candida</i> sp.	oleinska kiselina	<i>t</i> -amil alkohol	0,2 M AK, 0,27 M AD, 30 g L ⁻¹ lipaze, 55-60 °C, 50 g L ⁻¹ MS (0,4 nm)	21 g L ⁻¹	(125)
Novozym® 435	palmino ulje	<i>t</i> -amil alkohol	1,5 mmol AK, 12 mmol AD, 0,5 mL rastvarača, 40 mg lipaze, 40 °C, 16 h, 40 mg MS (0,5 nm)	70-75 % (61 % AO, 30 % AP, 9 % AL)	(48)
Novozym® 435	metil-estri masnih kiselina iz svinjske masti	30 % <i>t</i> -amil alkohol 70 % izooktan	0,1 mmol AK, 1,02 mmol AD, 10 mL medijuma, 12,5 % (w/w) AD lipaze, 54,6 °C, 34,32 h	69,18 % (RSM)	(126)
Chirazyme® L-2	vinil-estri kaprilne, kaprinske, laurinske i palmitinske kiseline	<i>t</i> -butanol acetone	1 mmol AK, 2-3 mmol AD, 1 mL medijuma, 50 mg lipaze, 40 °C, 48 h, 200 mg MS, (0,3 nm)	91 %	(127)
Lypozyme® TL-IM Novozym® 435	vinil-estar palmitinske kiseline, triolein, tripalmitin, maslinovo ulje	<i>t</i> -amil alkohol	100 mM AK, 100-300 mM AD, 20 mg mL ⁻¹ lipaze, 40 °C, 100 h	100 % (vinil-estar), 50 % (tripalmitin), 84 % (triolein), 33 % (maslinovo ulje)	(50)
Novozym® 435	palmitinska i oleinska kiselina	jonske tečnosti [sBmim][BF ₄], [2Pentmim][BF ₄] sa hidrofobnim aditivima	0,2 M AK, 0,2-0,24 M AD, 0,5 mL medijuma, 45 mg lipaze, 60 °C, 14 h, 50 mg MS (0,4 nm) ili vakuum (<1,0 mm Hg)	83 %	(128)

Novozym® 435 obložen sa PEI	maslinovo i palmينو ulje	<i>t</i> -amil alkohol	352 mM AK, 704 mM AD, 10 % (w/v) lipaze, 45 °C, 24-48 h, anhidrovani rastvarač (MS)	40 % AO + 50 % AP (palmينو ulje) 80 % AO + 10 % AP (maslinovo ulje)	(129)
Chirazyme® L-1, L-2, L-2 C2, L-2 C5 Chirazyme® L-5 Chirazyme® L-9, L-9 C2	kaprinska, laurinska i miristinska kiselina	acetone	40 g AK, 200 mM AD, 350 mL rastvarača, 3 g lipaze, 50 °C, 175 min vreme zadržavanja	60 g L ⁻¹ dan ⁻¹	(47)
Novozym® 435	palmitinska kiselina	acetone	2,5 mmol IAK, 10 mmol AD, 150 mg lipaze, 20 mL medijuma, 50 °C, 48 h, 1 g MS (0,4 nm)	95,32 % (RSM)	(130)
Novozym® 435	svinjska mast	<i>t</i> -amil alkohol	1:2,24 molski odnos supstrata, 56,44 °C, 30 h, MS (0,4 nm), pakovani sloj, (1,07 mL min ⁻¹)	50,50 %	(126)
Lipozyme® TL-IM	vinil-acetat	acetone	4,8 mg AK, 7,58 mg AD, 90 mg lipaze, pH=7, 3 mL medijuma, 40 °C, 6 h, LiCl, MS	99 %	(51)
Novozym® 435	konjugovana linolna kisleina	jonska tečnost [TOMA][TFA]	2,11 M AK, 2 M AD, 15 % lipaze, 70 °C, 32 h	>200 g L ⁻¹	(131)
Chirazyme® L-2 C2 Chirazyme® L-2 C3	konjugovana linolna kisleina	acetonitril acetone 2-metil-2-pentanol	0,125 mmol AK, 0,625 mmol AD, 2,5 mL medijuma, 50 mg lipaze, 50 °C, 24-72 h	~30 % AL ~45 % <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-konjugovana linolna kiselina AE ~70 % <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-konjugovana linolna kiselina AE	(132)
Novozym® 435	palmitinska kiselina	<i>t</i> -amil alkohol	0,2 mmol AK, 1 mmol AD, 15 % (w/w) lipaze, 3 mL medijuma, 70 °C, 1 h, 74 mg MS, (0,3 nm), mikrotalasi	71 % (RSM)	(133)

AK - askorbinska kiselina, IAK - izoaskorbinska kiselina, AD - acil-donor, AO - askorbil-oleat, AP - askorbil-palmitat, AL - askorbil-linolat, AE - askorbil-estar, MS - molekulska sita, [sBmim][BF4] - 1-(1-metilpropil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroborat, [2Pentmim][BF4] - 1-(1-metil butil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroborat, [TOMA][TFA] - metiltrioktilamonijum-trifluoroacetat.

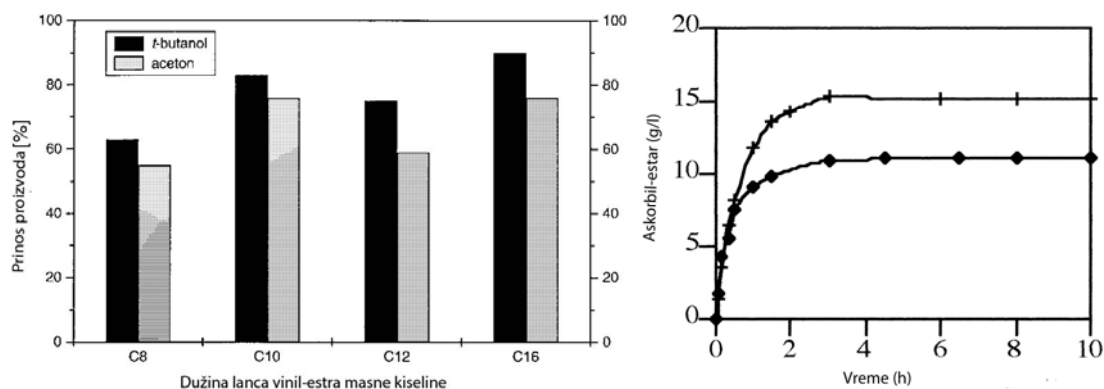
2.2.3.1. Uticaj acil-donora na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

Karboksilne kiseline različite dužine lanca (C2 do C22), njihovi metil-, etil- i vinil-estri, kao i trigliceridi i ulja su do sada primenjivani u cilju dobijanja čistih L-askorbil-estara ili njihove smeše (slika 2.9.). Poznato je da dužina lanca acil-donora ima uticaj na formiranje proizvoda u esterifikacijama i transesterifikacijama (41, 134). Kada je ispitivan afinitet biokatalizatora prema nabrojanim acil-donorima, dobijani su veoma različiti rezultati.



Slika 2.9. Donori acil-ostatka.

U radu u kome je ispitivan uticaj dužine lanca acil-ostatka vinil-estara masnih kiselina (C8-C16) na tok sinteze estara vitamina C katalizovane sa CAL B u acetonu i *t*-butanolu kao rastvaračima ustanovljeno je da povećanje broja C atoma donora acil-ostatka dovodi do porasta prinosa (slika 2.10.a) (127). Takođe je i Song sa kolegama utvrdio da su početne brzine reakcije i molarne konverzije veće kada je korišćen isti enzim pri sintezi askorbil-stearata u poređenju sa lauratom i palmitatom, kao i da postignuti prinosi rastu sa povećanjem stepena nezasićenosti acil-donora sa istim brojem C atoma (C18) (tabela 2.2.). Autori su izneli stav da jasnog objašnjenja za ovu pojavu nema, ali da je ovaj fenomen najverovatnije povezan sa difuzijom masne kiseline i imobilisane lipaze u organskom medijumu (135). Sa druge strane, Stamatis je sa kolegama utvrdio da je CAL B visokoselektivna prema masnim kiselinama sa 12-18 C atoma, ali da se veći prinosi postižu sa kraćim acil-donorima.(49). Objavljeni su i rezultati studije u kojoj je pokazano da broj C atoma donora acil-ostatka nema uticaja na ostvareni stepen konverzije (47). Bradoo (Bradoo) sa sar. je vršio skrining nekoliko lipaza kao biokatalizatora sinteze različitih acil-L-askorbata u heksanu pod dejstvom mikrotalasa (136). Oba pogodna biokatalizatora, lipaza iz *B. stearothermophilus* i iz *B. cepacia*, pokazale su veću selektivnost prema kiselinama dužeg lanca.



Slika 2.10. Uticaj dužine lanca acil-donora na prinos askorbil-estra: (a) – kada su korišćeni vinil-estri masnih kiselina sa 8-16 C atoma (reakcioni uslovi: 50 mg lipaze Chirazyme® L-2, 1 mmol vit. C, molski odnos 1:2, 200 mg molekulkih sita veličine pora 0,3 nm, 1 mL rastvarača, na 40°C) (127); (b) – kada su korišćene dokosaheksaenska (DHA, krstići) i eikosapentaenska (EPA, rombovi) kiselina (55 °C, molski odnos 1:5, EPA 112 g L⁻¹, DHA 121 g L⁻¹, 12 g L⁻¹ vitamina C, 20 mL *t*-amil alkohola,) (43).

Tabela 2.2. Uticaj dužine lanca i stepena nezasićenosti donora acil-ostatka na početnu brzinu i prinos reakcije sinteze askorbil-estara masnih kiselina katalizovanih lipazom (135).

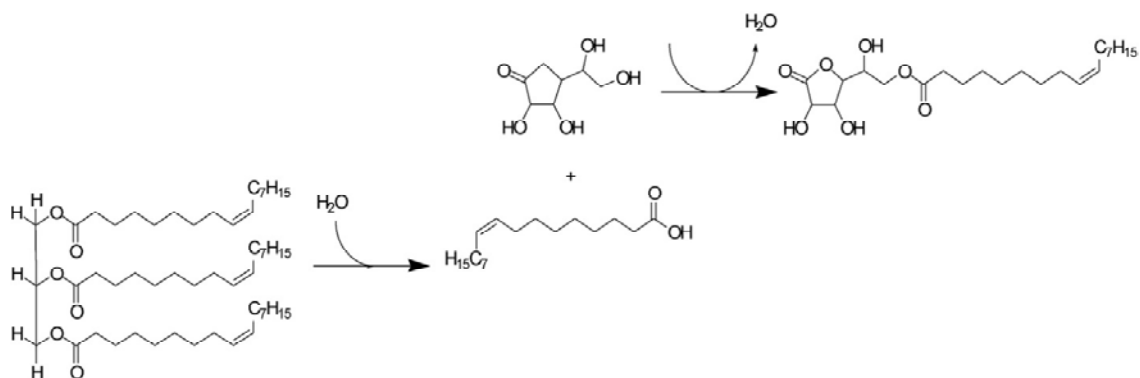
Masna kiselina	Laurinska kiselina	Palmitinska kiselina	Stearinska kiselina	Oleinska kiselina	Linolna kiselina
Početna brzina, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$	16,6	17,5	19,4	23,3	24,0
Konverzija, %	6,1	8,4	9,6	19,3	21,2

Reakcioni uslovi: 50 °C, 1 mmol vitamina C, 1,5 mmol acil-donora, 100 mg Novozym®-a 435 i 5 mL *t*-amil alkohola.

U poslednje vreme sve veća pažnja istraživača usmerena je na primenu nezasićenih donora acil-ostatka, s obzirom na njihovu veću nutritivnu vrednost i potvrđena antioksidativna svojstva. Rezultati studije u kojoj su kao acil-donori korišćeni etil-estri dokosaheksaenske (DHA) i eikosapentaenske (EPA) kiseline (slika 2.10.b) pokazali su da se korišćenjem kiseline sa većim brojem C atoma postižu viši prinosi u sintezi katalizovanoj komercijalnim preparatom Novozym® 435 (43). Serija nezasićenih masnih kiselina - oleinska, linolna, α -linolenska i γ -linolenska, korišćena je u enzimskoj reakciji esterifikacije L-askorbinskom kiselinom, pri čemu su nešto veći prinosi postignuti sa acil-donorima koji imaju dve dvostruke veze (44). U istraživanju u kome je Song sa saradnicima pratio tok sinteze askorbil-linolata sa linolnom kiselinom i metil-linolatom kao donorima acil-grupe, utvrđeno je da se veće početne brzine i konverzije postižu u slučaju korišćenja aktiviranog acil-donora (135). Upotrebom vinil-palmitata u reakciji transesterifikacije sa vitaminom C postignuta je konverzija od gotovo 100 %, za razliku od reakcija sinteze u kojima je pod

istim uslovima sa palmitinskom kiselinom i etil-palmitatom kao acil-donorima postignut prinos od oko 20 % (50). Upotrebom metil-oleata, autori su pod istim ostalim reakcionim uslovima postigli stepen konverzije 50 %. U istoj studiji, ispitana je i mogućnost korišćenja triglicerida kao donora acil-ostatka, s obzirom na visoku cenu vinil-estara masnih kiselina dugog lanca. Sa trioleinom su postignuti nešto viši prinosi nego sa tripalmitinom, verovatno zbog bolje mešljivosti sa komponentama reakcione smeše, i znatno bolji rezultati nego sa maslinovim uljem. Askorbil-oleat je pokazao bolja emulgjuća svojstva od askorbil-palmitata, a oba estra su imala nešto niži kapacitet za vezivanje slobodnih radikala od samog vitamina C. Utvrđeno je i da se, pored askorbil-estara, formiraju i mono- i diacilgliceroli kao sporedni proizvodi koji poseduju emulgjuća svojstva, pa njihovo uklanjanje iz reakcione smeše nije neophodno. Viklund je sa saradnicima utvrdio da je askorbil-oleat amorfni i da ima znatno nižu tačku topljenja i manju entalpiju topljenja u poređenju sa askorbil-palmitatom. Iz tog razloga ovaj estar bio je rastvorljiviji u uljima i samim tim pokazao jače antioksidativno dejstvo (46).

U nekoliko studija ispitana je i mogućnost korišćenja ulja u reakcijama transesterifikacije sa vitaminom C, u kojima se dobija smeša proizvoda čiji sastav zavisi od masnokiselinskog sastava donora acil-ostataka. S obzirom na to da su ulja dostupne i jeftine sirovine, njihova primena svakako pruža mogućnost snižavanja cene čitavog procesa. Burham je sa saradnicima sa palminim uljem kao supstratom (slika 2.11.) postigao stepen konverzije do 75 % i koncentraciju proizvoda do 40 g L⁻¹. Dobijena smeša askorbil-estara (oleat : palmitat : stearat = 61 % : 30 % : 9 %) poseduje antioksidativnu aktivnost oko 10 puta manju od askorbil-palmitata (48). U drugom istraživanju, reakcija transesterifikacije vitamina C i metil-estara kiselina dobijenih hidrolizom svinjske masti sastava C14:0 (1,5 %), C16:0 (26 %), C16:1 (2,5 %), C18:0 (13 %), C18:1 (45 %) i C18:2 (12 %) izvođena je u medijumu sastavljenom iz smeše rastvarača i optimizovana metodom odzivnih površina i centralnog kompozitnog plana, pri čemu je ostvarena konverzija od 69,18 % (126). Askorbil-estri sintetisani su i u reakciji između vitamina C i biodizela dobijenog iz sojinog i palminog ulja, katalizovanoj lipazom Novozym[®] 435 u acetonu (137). Pri korišćenju metil-estara palminog ulja u reakciji transesterifikacije sa L-askorbinskom kiselinom, postignuta je molarna konverzija od 62 %, pri čemu je smeša nastalih estara bila sledećeg sastava: 45,89 % palmitata, 42,59 % oleata i 10,1 % linolata. Acilovanjem vitamina C metil-estrima sojinog ulja, dobijen je prinos od 17 %. Proizvod je bio sastavljen iz smeše askorbil-estara - oleata, palmitata i linolata u odnosu 20,68 : 10,08 : 64,96.

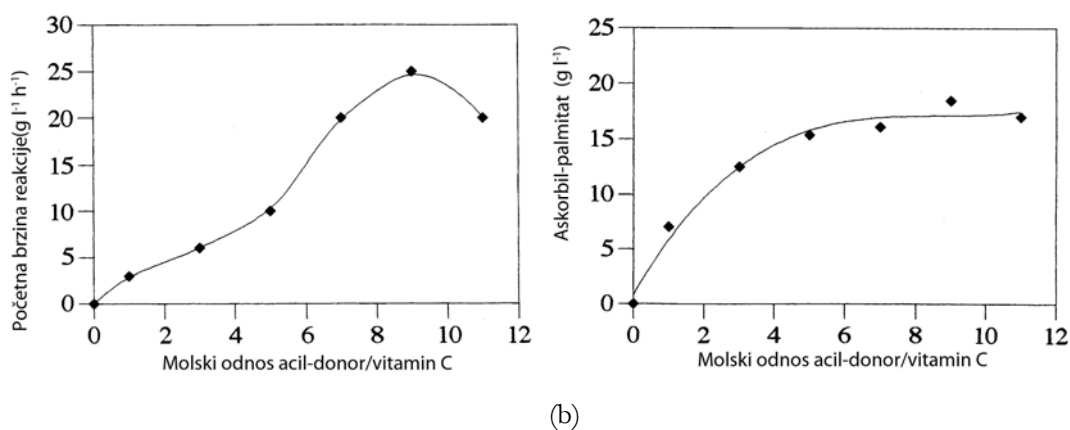


Slika 2.11. Dobijanje askorbil-estara masnih kiselina katalizovano lipazama korišćenjem palminog ulja kao donora acil-ostatka (48).

2.2.3.2. Uticaj koncentracije i molskog odnosa supstrata na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

Odzivne veličine - konverzija limitirajućeg supstrata (%) i finalna koncentracija proizvoda (g L^{-1} ili mmol L^{-1}) u velikoj meri zavise od koncentracije supstrata. Generalno, kako pri korišćenju masnih kiselina, tako i pri upotrebi aktiviranih acil-donora, najbolji rezultati su postizani kada je limitirajući supstrat bio vitamin C, iako su optimumi varirali u širokom opsegu, pa su maksimalni prinosi ostvarivani pri višku acil-donora od 1:2 do 1:10. Efekat molskog odnosa supstrata na tok enzimske sinteze estara vitamina C, ispitivan je od strane nekoliko autora. Humeau je sa saradnicima među prvima analizirao uticaj dodavanja viška metil-palmitata (slika 2.12.) na početnu brzinu reakcije tj. aktivnost biokatalizatora i prinos proizvoda tj. položaj ravnoteže (138). Povećanje koncentracije hidrofobne komponente (acil-donora) reakcione smeše povećava log P (logaritam koeficijenta raspodele nejonizovanog jedinjenja između oktanola i vode) vrednost medijuma, kako u mikro- tako i u makrookruženju enzima, i indukuje konformacione promene u molekulu lipaze, čineći njen aktivni centar lakše dostupnim molekulima supstrata. Pri molskim odnosima iznad 1:9, autori su uočili pad početne brzine biosinteze, što su objasnili otežavanjem pristupa hidrofилne askorbinske kiseline aktivnom centru, s obzirom na interakcije velikih količina metil-palmitata sa površinom enzima i hidrofobnim zidovima kanala aktivnog centra. Ispitan je i uticaj viška donora acil-ostatka na proizvedenu količinu estra, pri čemu je pokazano da se položaj ravnoteže pomera ka transesterifikaciji sa povećanjem koncentracije metil-palmitata. Maksimalan prinos od 19 g L^{-1} postignut je pri molskom odnosu 1:9, pri čemu su blagi pad sa daljim porastom količine acil-donora u reakcionoj smeši autori obrazložili inhibicijom proizvodom. Da bi detaljnije razmotrili prirodu

interakcija koje CAL B čine aktivnijom u medijumima veće hidrofnosti, autori su u jednoj seriji eksperimenata deo viška metil-palmitata zamenili hidrofnim rastvaračem (dodekanom) tako da je log P medijuma bio konstantan. U reakcijama u kojima je molski odnos supstrata bio nizak nisu uočeni nikakvi pozitivni efekti dodavanja dodekana, a došlo je i do inaktivacije enzima. Zaključeno je da, i pored nesumnjivog značaja hidrofnosti medijuma koji okružuje lipazu u formiranju i stabilizovanju njene aktivne forme, log P vrednost reakcione smeše nije presudan parametar za postizanje većih početnih brzina. Po svemu sudeći, ključnu ulogu u ovom procesu igra formiranje odgovarajućih veza specifičnih za određene supstrate između hidrofnog medijuma i enzima. Takođe je i Lerin sa saradnicima, koristeći metodu odzivnih površina i centralni kompozitni plan odredio da je molski odnos vitamina C prema palmitinskoj kiselini od 1:9 optimalan (45).



Slika 2.12. Uticaj viška donora acil-ostataka na početnu brzinu reakcije (a) i prinos askorbil-palmitata (b) u transesterifikaciji vitamina C i metil-palmitata katalizovanoj lipazom (138).

Pri optimizaciji molskog odnosa askorbinske kiseline prema metil-oleatu, u studiji posvećenoj biosintezi askorbil-oleata ustanovljeno je da povećanje sadržaja acil-donora do odnosa 1:4 dovodi do naglog, a preko toga do neznatnog porasta stepena konverzije (139). U radu, čiji je cilj takođe bio određivanje optimalnih reakcionih uslova za enzimsko dobijanje askorbil-oleata, utvrđeno je da povećanje koncentracije oleinske kiseline kao acil-donora do 250 mM (sadržaj vitamina C je bio konstantan - 150 mM) dovodi do povećanja početne brzine i prinosa reakcije (125). Nasuprot tome, Viklund i sar. su konverziju od 87 % postigli sa viškom vitamina C (molski odnos oleinske prema askorbinskoj kiselini 1:2) u slučaju sinteze askorbil-oleata, dok je sa palmitinskom kiselinom kao acil-donorom stepen konverzije bio 86 % kada je u višku bio acil-donor (molski odnos askorbinske prema palmitinskoj kiselini 1:2) (46). Askorbil-oleat je, pri tom, pokazao snažnije antioksidativne

efekte od askorbil-palmitata, što je verovatno posledica njegove bolje rastvorljivosti u uljima.

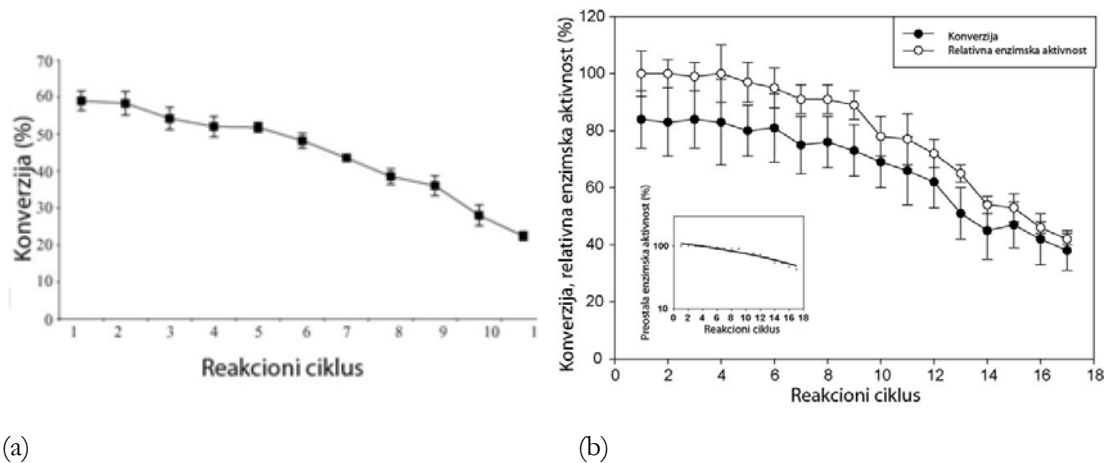
U većini istraživanja u kojima je cilj bilo maksimizovanje stepena konverzije, korišćena je niža koncentracija (do 0,1 M) (46, 139, 140), dok je u slučajevima kada je izlazna veličina bio prinos proizvoda, bila upotrebljavana veća količina vitamina C u polaznoj reakcionoj smeši (48, 125, 138). Što se tiče uticaja primenjene koncentracije vitamina C kao limitirajućeg supstrata, samo je nekoliko autora ovaj parametar optimizovalo (44, 131, 141). U studiji posvećenoj optimizaciji enzimske sinteze askorbil-benzoata u cikloheksanonu metodom odzivnih površina i centralnog kompozitnog dizajna, maksimalna konverzija postignuta je pri koncentraciji supstrata (ekvimolarni odnos vitamina C i benzoeve kiseline) od 0,1031 M (141). Kuvabara (Kuwabara) i sar. su ispitivali uticaj koncentracije L-askorbinske kiseline na ravnotežnu koncentraciju askorbil-oleata pri molaskom odnosu supstrata u opsegu 1:1 - 1:7,5 (vitamin C : oleinska kiselina) (44). Ustanovljeno je da pri molaskom odnosu 1:1 prinos estra linearno raste pri povećanju koncentracije vitamina C u čitavom ispitivanom opsegu (25-200 mM), dok je pri ostalim molaskim odnosima linearna zavisnost postojala kada je koncentracija L-askorbinske kiseline bila niža, ali je sa daljim povećanjem rast prinosa postajao znatno manji. Autori su ovu pojavu objasnili ograničenom rastvorljivošću vitamina C u acetonu na 50 °C, tako da je pri njegovim višim koncentracijama samo u potpunosti rastvorena količina mogla proreagovati. Jang (Yang) je sa kolegama pri ispitivanju efekta početne koncentracije vitamina C na prinos askorbil-estra konjugovane linolne kiseline u *t*-butanolu maksimalnu koncentraciju proizvoda postigao pri najvećoj primenjenoj vrednosti – 0,28 M vitamina C (131).

2.2.3.3. Uticaj vrste i koncentracije lipaze na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

Lipaze koje su do sada pokazale aktivnost u reakciji sinteze L-askorbil-estara su malobrojne, a u upotrebi su uglavnom skupi komercijalni imobilisani preparati. Kao što je već navedeno u poglavlju 2.2.1., uspešno su primenjivane mikrobne lipaze sledećih producenata: *C. antarctica*, lipaza B (43-46) i A (47), *R. miehei* (48, 49), *T. lanuginosus* (50-52), *Bacillus stearothermophilus* SB-1 (53), *Burkholderia multivorans* (54) i *Burkholderia cepacia* RGP-10 (47, 55). U narednom poglavlju će biti navedeni primeri istraživanja u kojima su neki od nabrojanih enzima upoređivani sa aspekta svoje katalitičke aktivnosti i stabilnosti, kao i rezultati istraživanja u kojima je optimizovana količina biokatalizatora. Ukratko će biti

prikazani i rezultati ostvareni kada su korišćeni nekomercijalni preparati koji su se pokazali kao efikasni biokatalizatori u reakcijama sinteze L-askorbil-estara karboksilnih kiselina.

Burham i sar. ispitali su uticaj vrste i koncentracije lipaze na reakciju transesterifikacije palminog ulja i vitamina C u *t*-amil alkoholu. Utvrđeno je da je redosled aktivnosti upotrebljenih komercijalnih enzimskih preparata sledeći: Novozym[®] 435 > Lipozyme[®] TL-IM > Lipozyme[®] RM-IM i da je optimalni sadržaj lipaze sa aspekta koncentracije proizvoda, 12 %(w/v) (izraženo na masu supstrata) (48). Enzimi Lipozyme[®] TL-IM i Novozym[®] 435 upoređeni su kao biokatalizatori u reakciji transesterifikacije vitamina C i triglicerida (50). Lipozyme[®] TL-IM je, i pored toga što su pri njegovom korišćenju postignuti nešto niži prinosi, okarakterisan kao enzim koji proces čini ekonomičnijim, s obzirom na deset puta nižu cenu, i zato je pri daljoj optimizaciji procesnih parametara korišćen ovaj preparat.



Slika 2.13. Upotreba lipaze Chirazyme[®] L-2 C2 u konsektivnim reakcionim ciklusima biosinteze askorbil-oleata: (a) - u organskom rastvaraču (139); (b) - u jonskoj tečnosti (142).

U istraživanju posvećenom biosintezi askorbil-oleata upotrebljena je lipaza iz *Candida antarctica* tipa A imobilisana na nosač tipa 1 (Chirazyme[®] L-5; C1) i tipa B imobilisana na nosače tipa 1, 2 i 3 (Chirazyme[®] L-2; C1, C2 i C3) i Novozym[®] 435, kao i sirova lipaza istog producenta (139). Značajno bolji rezultati postignuti su kada je korišćen izoenzim B u odnosu na one dobijene sa izoenzimom A (10-20 % veće konverzije), a prinosi su u tom slučaju bili za 10-15 % viši i od onih postignutih sa sirovim enzimskim preparatom. Za enzim koji je korišćen u daljim eksperimentima, Chirazyme[®] L-2 C2, upotrebom u konsektivnim reakcionim ciklusima, određena je operativna stabilnost – poluživot imobilizovanog preparata iznosio je deset dana (slika 2.13.a). U studiji u kojoj je

upotrebljen isti komercijalni enzimski preparat, jonska tečnost [Bmim][BF₄] korišćena kao reakcioni medijum i parovi hidrata soli dodavani u cilju kontrole sadržaja vode, takođe je ispitivana operativna stabilnost lipaze (142). Biokatalizator je korišćen u 16 konsektivnih reakcionih ciklusa i ustanovljeno je da proces inaktivacije sledi kinetiku prvog reda (slika 2.13.b).

Lerin je sa saradnicima pri optimizaciji enzimske sinteze askorbil-palmitata varirao koncentraciju biokatalizatora (Novozym[®] 435) u opsegu od 1 do 20 %(w/v) (izraženo prema koncentraciji supstrata), pri čemu su maksimalne vrednosti konverzije i početne brzine postignute sa 15 %(w/v) lipaze (45). Pad prinosa pri daljem povećanju sadržaja enzima u reakcionoj smeši objašnjen je pojavom agregata koji aktivni centar enzima čine teže dostupnim molekulima supstrata. Sličan rezultat je u svojoj studiji posvećenoj biosintezi askorbil-linolata dobio i Song sa kolegama - vreme za koje je postizana ravnoteža opadalo je sa porastom koncentracije enzima do 80 g L⁻¹, dok je dalje povećanje sadržaja lipaze dovelo do pada početne brzine reakcije (125).

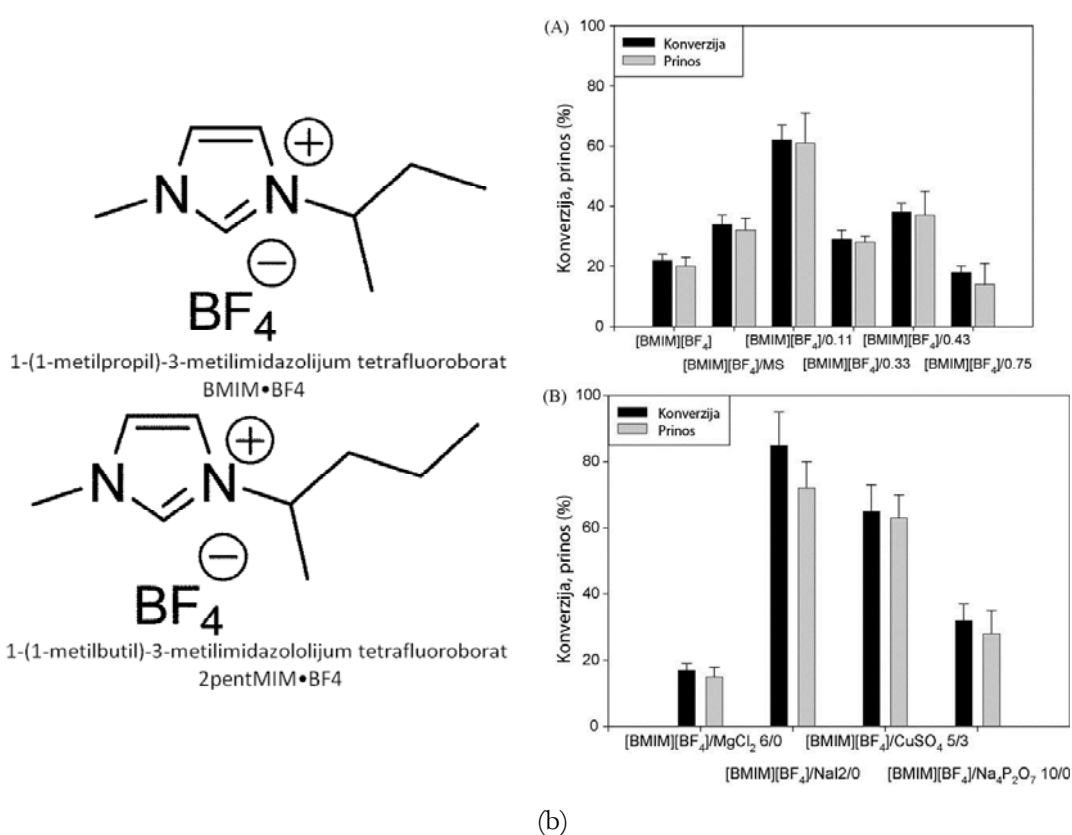
Kada je izuzetno termostabilna lipaza producenta *B. stearothermophilus* imobilisana na Accurel[®], ostvaren je prinos askorbil-palmitata od 97 % nakon pola sata u sistemu bez rastvarača na 100 °C (53). Iako su pod ovakvim uslovima termalna inaktivacija lipaze i degradiranje vitamina C bili očekivani, autori su prijavili da se u 5 konsektivnih reakcionih ciklusa aktivnost imobilisanog enzima zanemarljivo menja. Kao drugi potencijalni nekomercijalni katalizator za biosintezu askorbil-palmitata prijavljena je liofilizovana lipaza iz *B. cepacia* obložena slojem nejonskog surfaktanta – propilenglikol-monostearata koja je pokazala povećanje aktivnosti u odnosu na slobodnu lipazu dovodeći do skoka stepena konverzije sa samo 6 na 47 % (55). Lipaza iz *B. multivorans* imobilisana na neutralni aluminijum-oksidi je uspešno primenjena u sintezi askorbil-estara masnih kiselina u sistemu bez rastvarača pod dejstvom mikrotalasa (54). Nedavno je grupa autora testirala različite nosače: Duolite[®], Lewatit[®] 1600 i Lewatit[®] Gx 105, za imobilizaciju CAL B, TLL i RML u cilju primene u sintezi L-askorbil-estara transesterifikacijom vitamina C i maslinovog ulja (129). Najviši prinos je ostvaren kada je Novozym[®] 435 obložen sa PEI-om (polietilenimin). Među imobilisanim preparatima TLL, nejefikasniji je bio enzim vezan za Duolite[®] i obložen sa PEI-om, dok nijedan preparat imobilisane RML nije pokazao transesterifikacionu aktivnost.

2.2.3.4. Uticaj reakcione sredine na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

U biokatalizovanom procesu sinteze askorbil-estara masnih kiselina razlika u rastvorljivosti supstrata sužava izbor pogodnog reakcionog medijuma na mali broj organskih rastvarača, jonske tečnosti i nadkritične fluide. U biosintezama estara se uglavnom koriste organski rastvarači sa visokim log P vrednostima, međutim hidrofilni karakter askorbinske kiseline čini ih nepogodnom reakcionom sredinom za dobijanje estara vitamina C i masnih kiselina (126, 143, 144). Pored značaja za rastvorljivost komponenata reakcione smeše i prenos mase u sistemu, izbor organskog rastvarača utiče i na katalitičku aktivnost enzima, s obzirom na to da različiti medijumi imaju različitu sklonost ka narušavanju esencijalnog monomolekuskog sloja vode koji okružuje imobilisanu lipazu (145). U dostupnoj literaturi je najzastupljenija upotreba tercijarnih alkohola (*t*-butanol – log P = 0,58 i *t*-amil alkohol – log P = 1,15) u ovu svrhu. Veliki broj autora prijavljuje dobre rezultate u acetonu (log P = -0,21) koji zbog GRAS statusa, niske cene i velike isparljivosti privlači sve veću pažnju (44, 137, 139, 146). U acetonitrilu čiji je log P još negativniji (-0,394) uspešno je sintetisan askorbil-laurat (140). Utvrđeno je i da dodavanje hidrofobnog rastvarača umesto jednog dela viška acil-donora, dovodi do smanjenja prinosa (138).

Lerin i sar. su ispitali mogućnost biosinteze askorbil-palmitata u seriji organskih rastvarača (etanol – log P = -0,24, 2-propanol – log P = 0,05, *n*-propanol – log P = 0,25, *t*-butanol – log P = 0,8 i petrol-etar – log P = 3,2) (45). Proizvod je detektovan samo u slučaju korišćenja *t*-butanola. Autori su izostanak reakcije u rastvaračima veće polarosti pripisali “odvođenju” vode esencijalne za održavanje aktivne konformacije korišćenih enzima. Grupa autora je zadovoljavajuće prinose pri biosintezi L-askorbil-benzoata postigla koristeći cikloheksanon (log P = 0,96) i aceton (log P = -0,23) kao rastvarače (141). Najopsežniju studiju posvećenu izboru pogodnog rastvarača koji bi bio korišćen za enzimsku sintezu askorbil-estra oleinske kiseline, sproveli su Song i Vei (Wei) (125). Oni su među osam ispitanih rastvarača (etanol – log P = -0,24, tetrahidrofuran – log P = 0,49, piridin – log P = 0,71, butanol – log P = 0,8, *t*-amil alkohol – log P = 1,15, heksanol – log P = 1,8, oktanol – log P = 2,9 i heksan – log P = 3,5) askorbil-oleat detektovali samo u slučaju upotrebe *t*-amil alkohola. Kada su metil-estri masnih kiselina iz svinjske masti bili korišćeni kao donori acil-ostataka u reakciji sinteze askorbil-estara katalizovanoj imobilisanom lipazom, smeše sastavljene iz različitih udela po dva rastvarača (jedan sa nižim, jedan sa višim log P), bile su upotrebljene kao reakcioni medijumi (126). Među 54 eksperimenta u kojima je korišćenjem acetona, *t*-butanola, *t*-pentanola, *n*-heksana, *n*-

heptana i izooktana ostvaren gradijent polarnosti reakcione sredine u širokom opsegu, najveća konverzija – 31,6 %, postignuta je u medijumu sastavljenom iz 30 % *t*-pentanola i 70 % izooktana. U nedavno objavljenoj studiji je kao optimalan medijum za biosintezu L-askorbil-undecilenata navedena smeša *t*-butanola i 2-metiltetrahidrofurana dobijenog iz biomase (1:4, v/v). U poređenju sa najčešće korišćenim rastvaračima (*t*-butanolom, *t*-amil-alkoholom i acetonom), pored najveće rastvorljivosti supstrata, ovaj medijum je obezbedio i uslove maksimalne aktivnosti i stabilnosti enzima, što je potkrepljeno činjenicom da je došlo do snižavanja energije aktivacije (sa 38,1-39,1 na 26,6 kJ mol⁻¹) i da je katalitička aktivnost enzima u takvim uslovima poboljšana (V_{max}/K_m sa 1,3-1,4 h⁻¹ do 8,4 h⁻¹) (147).



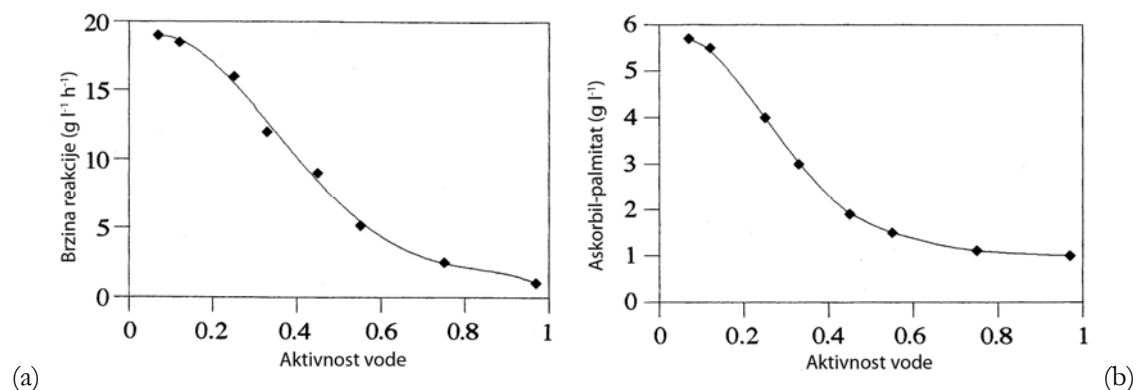
Slika 2.14. Biosinteza askorbil-estara u jonskim tečnostima: (a) strukture jonskih tečnosti; (b) biosinteza askorbil-oleata.

Alternativni rastvarači, kao što su nadkritični fluidi (NKF) i jonske tečnosti (JT), predstavljaju potencijalno pogodnu zamenu za organske rastvarače, ali u slučaju njihove upotrebe cena procesa značajno raste (14, 148). Jonske tečnosti su neisparljive supstance koje dobro rastvaraju jedinjenja različite hidrofobnosti. Omogućavaju rad na višim temperaturama i uklanjanje proizvoda vakuumom, pa je moguće ostvariti veće prinose čak i pri ekvimolarnim uslovima. Mogu se lako podesiti njihove osobine, a postoji i mogućnost

ponovnog korišćenja. Netoksične su, a njihova primena proces u kome se koriste čini “zelenim”, ekološki prihvatljivim. Sa druge strane, problemi koji ograničavaju njihovu širu upotrebu vezani su za nepouzdanost metoda primenjivanih za određivanje toksičnosti, mogućnost inaktivacije enzima, kao i visoke cene (149). U biokatalizovanim reakcijama koriste se kao monofazni ili dvofazni (JT/organski rastvarač, JT/NKF, JT/H₂O) sistemi (14). Nekoliko autora je upotrebilo jonske tečnosti u sintezi askorbil-estara masnih kiselina katalizovanoj lipazom. 1-butil-3-metilimidazolijum-tetrafluoroborat ([Bmim][BF₄]), metiltrioktilamonijum-trifluoroacetat ([TOMA][TFA]), 1-(1-metilpropil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroborat ([sBmim][BF₄]) i 1-(1-metil butil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroborat ([2Pentmim][BF₄]) su do sada uspešno primenjeni (128, 131, 142). Park i saradnici su među testiranim JT (slika 2.14.a) najveću molarnu konverziju (43 %) postigli u [sBmim][BF₄], a zatim je u sintetisanom [2Pentmim][BF₄] koji poseduje jedan C atom više, i u kome je rastvorljivost palmitinske kiseline bila veća, postignut dalji rast prinosa askorbil-palmitata (74 %) (128). Autori su naveli da je primenom jonskih tečnosti umesto polarnih organskih rastvarača ostvareno nekoliko prednosti: umanjena je inaktivacija CAL B, eliminisana je toksičnost povezana sa upotrebom isparljivih organskih jedinjenja, a izvođenjem reakcije pod vakuumom izbegnuta je potreba za korišćenjem masnih kiselina u višku ili aktiviranih acil-donora. Međutim, primećena je inhibicija proizvodom, izazvana njegovom precipitacijom na česticama biokatalizatora, pa je ipak u cilju postizanja viših prinosa dodavano 20 % hidrofobnog aditiva u reakcionu smešu. Druga grupa autora je u reakciji izvedenoj u [Bmim][BF₄], pri kontrolisanoj aktivnosti vode 0,3 (primenom para NaI·2H₂O/NaI), dobila prinos od 72 % askorbil-oleata (slika 2.14.b) (142). Jang sa kolegama je promenom reakcionog medijuma od organskog rastvarača do jonske tečnosti ([TOMA][TFA]) u sintezi askorbil-estara konjugovane linolne kiseline katalizovanoj Novozym[®]-om 435 ostvario povećanje prinosa sa 35 g L⁻¹ na 150 g L⁻¹ (131). U tom slučaju bio je moguć rad na višoj temperaturi (sa 55 na 70 °C) i primena većih koncentracija vitamina C usled poboljšane rastvorljivosti.

Pored upotrebe jednog od supstrata u višku, uklanjanje sporednih produkata iz reakcione smeše je takođe pouzdan način za pomeranje položaja ravnoteže prema formiranju estera. Kada se kao acil-donori u sintezi L-askorbil-estara primenjuju masne kiseline, veće ravnotežne koncentracije proizvoda mogu se dobiti uklanjanjem inicijalno prisutne ili nastale vode iz reakcione smeše. Međutim, vodeni sloj koji okružuje molekul enzima, bitan je za očuvanje njegove katalitičke aktivnosti. Početna aktivnost vode uglavnom je, od

strane većine autora, podešavana uravnotežavanjem reakcione smeše i enzima pre reakcije u prisustvu vodene pare zasićenih rastvora soli poznate aktivnosti vode (a_v) (138, 139, 142). Najbolji rezultati postizani su pri najmanjim početnim aktivnostima vode (LiBr - $a_v=0,07$, LiCl - $a_v=0,11$). S obzirom na to da je voda sporedni proizvod reakcije esterifikacije vitamina C i masnih kiselina, kontrola njenog sadržaja u reakcionom medijumu predstavlja jedan od načina za povećanje ravnotežne koncentracije estera. Odvođenje iz reakcione smeše, vode nastale u toku reakcije esterifikacije, kao i metanola nastalog transesterifikacijom vitamina C i metil-estara masnih kiselina, može se efikasno vršiti dodavanjem molekulskih sita veličine pora od 0,3 do 0,5 nm na početku ili u toku reakcije, međutim na taj način dolazi do smanjenja ukupnog prostornog prinosa procesa (44, 148). Takođe je primenjivana i inkubacija komponenata reakcione smeše sa molekulskim sitima neposredno pre reakcije.



Slika 2.15. Uticaj početne aktivnosti vode reakcionog medijuma i enzima: (a) - na početnu brzinu reakcije; (b) - na ravnotežnu koncentraciju askorbil-palmitata (138).

Grupa autora je ispitala uticaj početne aktivnosti vode (a_v varirana u opsegu 0,07-0,97) na katalitičku aktivnost lipaze i na ravnotežnu koncentraciju proizvedenog askorbil-palmitata u reakciji transesterifikacije između vitamina C i metil-palmitata u *t*-amil alkoholu (138). Podešavanje a_v vršeno je prema metodi koju su opisali Goderis i njegovi saradnici uravnotežavanjem rastvorenih reaktanata i enzimskog preparata u odvojenim sudovima u toku 10 dana na 25 °C u prisustvu pare zasićenih vodenih rastvora soli poznatih aktivnosti vode ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($a_v=0,97$), NaCl ($a_v=0,75$), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ($a_v=0,55$), K_2CO_3 ($a_v=0,43$), MgCl_2 ($a_v=0,33$), KAc ($a_v=0,25$), LiCl ($a_v=0,12$) i LiBr ($a_v=0,07$)). U “najsuvljem” medijumu postignute su maksimalne vrednosti početne brzine, kao i prinosa (slika 2.15.). Navedeno je nekoliko razloga koji su mogli biti uzroci pada početne brzine reakcije sa povećanjem početne aktivnosti vode: nemogućnost dolaženja liposolubilnog acil-donora do površine

nosača kroz deblji sloj vode koji ga okružuje, stvaranje agregata čestica imobilizata pri većim aktivnostima vode i favorizovanje reakcija u suprotnom smeru (hidroliza i alkoholiza) pri čemu molekuli vode učestvuju kao reaktanti. HPLC (high performance liquid chromatography – tečna hromatografija visokih performansi) analize reakcione smeše su poslužile kao potpora trećoj pretpostavci, s obzirom na to da su autori uočili formiranje palmitinske kiseline. Iz istog razloga, najveća ravnotežna koncentracija askorbil-palmitata dobijena je u medijumu sa najnižom početnom aktivnošću vode.

U istraživanju čiji je cilj bila biosinteza askorbil-estara palmitinske i oleinske kiseline, isprobane su tri strategije kontrole sadržaja vode u reakcionom medijumu – uravnotežavanje zasićenim rastvorima soli (LiCl i MgCl₂) poznate aktivnosti vode, difuzija vode kroz silikonske cevi sa cirkulacijom zasićenih rastvora soli i dodavanje molekulskih sita (46). Za prva dva metoda autori su utvrdili da su nepogodni, s obzirom na to da je u oba slučaja došlo do reagovanja rastvarača (*t*-amil alkohola) sa solima. Kada su korišćena molekulska sita, dobijen je rastvarač sa sadržajem vode od 13 ppm, ali je proces trajao dugo. Da bi se osigurala niska koncentracija vode u medijumu u toku reakcije, vršena je izmena sita.

2.2.3.5. Uticaj temperature na biosintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

Temperatura ima značajan uticaj na stabilnost i aktivnost enzima, ali i na konstantu ravnoteže reakcije biosinteze askorbil-estara masnih kiselina (125). Tipične radne temperature kretale su se između 40 i 70 °C, ali kada su sprovedene detaljnije optimizacije, uglavnom su se optimumi kretali od 55 do 65 °C. Relativno visoki temperaturni optimumi ne iznenađuju, s obzirom na to da lipaza tipa B producenta *C. antarctica*, koja je najčešće korišćeni biokatalizator, spada u red lipaza sa visokim temperaturnim optimumom – ovaj enzim zadržava visoku aktivnost na temperaturama do 70 °C (16).

Pri ispitivanju uticaja temperature na enzimsku sintezu askorbil-oleata u *t*-amil alkoholu temperatura je varirana u opsegu 40-70 °C i utvrđeno je da je optimum sa aspekta početne brzine 60 °C, dok je maksimalan prinos proizvoda nakon 24 h postignut na 55 °C (125). U istraživanju posvećenom optimizaciji biokatalizovane sinteze askorbil-palmitata u *t*-butanolu, na osnovu statističkog modela (RSM i CCRD – central composite rotatable design) u ispitivanom opsegu temperatura 40-70 °C, najveći prinos proizvoda postignut je na 70 °C (45). Nasuprot tome, pri optimizaciji reakcionih uslova za biosintezu L-askorbil-laurata u acetonitrilu kao reakcionom medijumu metodom odzivnih površina, maksimalna

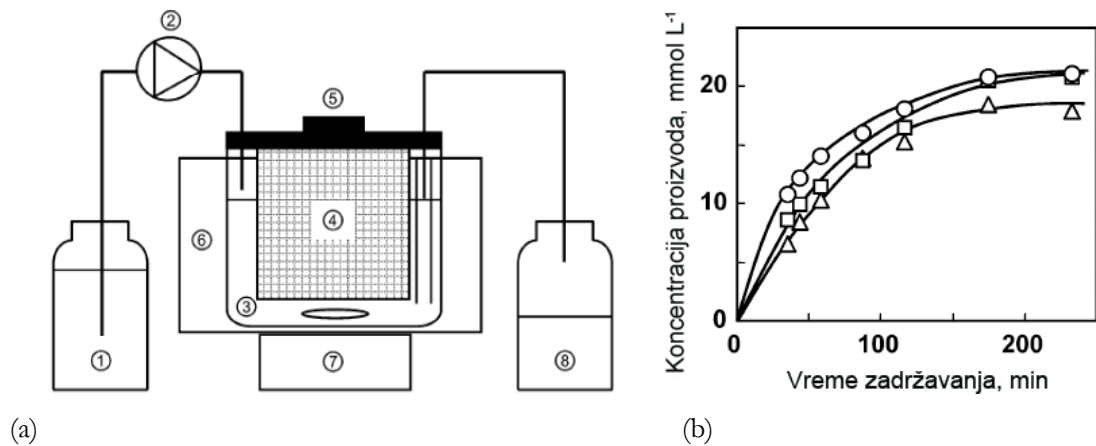
molarna konverzija limitirajućeg supstrata dobijena je na 30,6 °C (ispitivan je opseg od 25 do 65 °C) (140). Na ekstremno visokoj temperaturi - 100 °C, sintetisan je askorbil-palmitat u sistemu bez rastvarača u reakciji katalizovanoj izuzetno termostabilnom lipazom producenta *B. stearothermophilus* (53). Ovako velike razlike u vrednostima temperaturnih optimuma utvrđenim u nekoliko istraživanja verovatno su uzrokovane interaktivnim uticajem supstrata, proizvoda i organskog rastvarača, ali i primenjene lipaze na tok reakcije. S obzirom na osobine korišćenih lipaza uglavnom je isparljivost rastvarača, a ne stabilnost biokatalizatora bila limitirajući faktor za rad na još višim temperaturama.

2.2.4. Enzimska sinteza L-askorbil-estara karboksilnih kiselina u protočnim sistemima

Iako je najveći broj istraživanja posvećenih enzimskoj sintezi estara vitamina C i masnih kiselina izvođen u šaržnim sistemima, nekoliko autora je ispitalo i mogućnost njihovog dobijanja u protočnim reaktorskim sistemima. U daljem tekstu će stoga biti navedeni primeri primenjenih konfiguracija i rezultati koji su na taj način ostvareni.

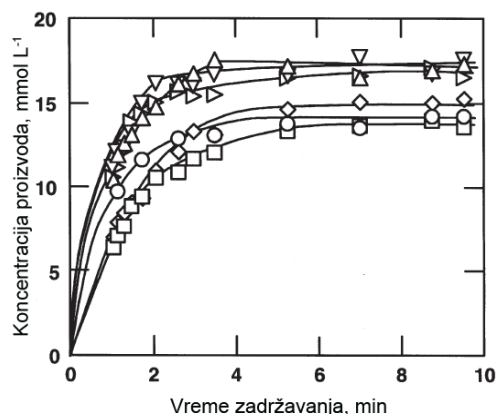
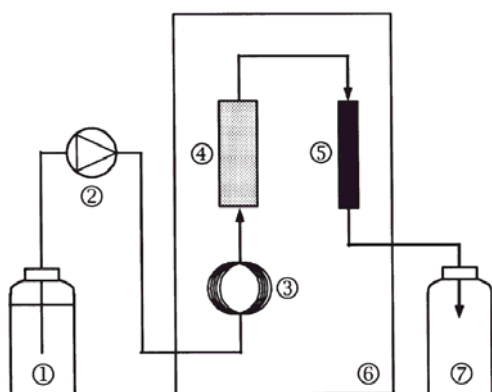
Grupa autora je u kontinualnim sistemima, i to sa pakovanim slojem i mehaničkim mešanjem, sintetisala seriju askorbil-estara zasićenih i nezasićenih masnih kiselina(47, 148). Mogućnost proizvodnje askorbil-estara kaprinske, laurinske i miristinske kiseline ispitana je u protočnom reaktoru sa mešanjem čija je konfiguracija predstavljena na slici 2.16.a. Količina od 3 g biokatalizatora (Chirazyme[®] L-2 C2) smeštana je u mrežastu korpu od nerđajućeg čelika visine 78 mm i prečnika 68 mm sa otvorima veličine 0,2 mm, uronjenu u reaktor visine 90 mm i prečnika 85 mm. U reaktor je upumpavana napojna smeša sastavljena iz 200 mmol kiseline po litru acetona, pri čemu je zapremina smeše koja se u svakom trenutku nalazila u reaktoru iznosila 350 mL. Sistem je termostatiran na 50 °C. Inicijalna količina od 40 g vitamina C je takođe dodavana u reaktor, pri čemu je svakog narednog dana rada dodavano po 20 g u cilju nadoknađivanja količine koja je proreagovala i one koja se rastvorila i napustila sistem sa efluentom. Ustanovljeno je da koncentracija sva tri estra raste sa povećanjem vremena zadržavanja, pa je kao optimalan usvojen protok napojne smeše od 2 mL min⁻¹ pri kome je vreme zadržavanja bilo 175 min (slika 2.16.b). U toku 5 dana ostvarena je produktivnost askorbil-laurata od 60 grama po litru reaktora i danu, nakon čega je, korišćenjem iste količine enzima, dobijena slična produktivnost kaprinata i miristata, pri čemu su ove dve sinteze trajale po 3 dana. Autori su zaključili da

primenjeni biokatalizator pokazuje zadovoljavajuću stabilnost pod prethodno opisanim procesnim uslovima u toku 11 dana rada (47).



Slika 2.16. (a) Šematski prikaz reaktorskog sistema za kontinualnu proizvodnju acil-askorbata: 1 – rezervoar sa napojnom smešom, 2 – pumpa, 3 – reaktor, 4 – korpa sa imobilisanom lipazom Chirazyme® L-2 C2, 5 – poklopac, 6 – vodeno kupatilo, 7 – magnetna mešalica, 8 – rezervoar sa efluentom; (b) Odnos vremena zadržavanja i koncentracije askorbil-kaprinata (O), -laurata (□) i -miristata (Δ) (47).

U narednoj publikaciji autori su u bioreaktoru sa pakovanim slojem, pored zasićenih, za esterifikaciju vitamina C koristili i nezasićene acil-donore – oleinsku, linolnu i arahidonsku kiselinu. Sistem je bio sastavljen iz dve redno vezane kolone (slika 2.17.a) spojene preko cevi unutrašnjeg prečnika 0,8 mm. U prvu, cilindričnu staklenu kolonu dimenzija 150×10 mm, napakovano je 40 g L-askorbinske kiseline, dok se u drugoj koloni od nerđajućeg čelika dimenzija 150×4,6 mm nalazio pakovani sloj čestica imobilisanog enzima (1,5 g). Napojna smeša sastavljena iz 200 mmol kiseline po litru acetona, zagrevana je na 50 °C i upumpavana u sistem protokom od 0,5 mL min⁻¹, tako da je odgovarajuće vreme zadržavanja iznosilo 5 minuta. U ovakvom režimu, u reaktorski sistem je kontinualno u toku 11 dana uvođen rastvor acil-donora u acetonu, i to arahidonske kiseline – 1 dan i ostalih po 2 dana. Pri ovim uslovima je postignut prinos od 14-17 mmol L⁻¹ tj. produktivnost od 1,6 do 1,9 kg L⁻¹ reaktora i danu, pri čemu su niži prinosi sa nezasićenim donorima acil-ostatka pripisani njihovoj manjoj čistoći (slika 2.17.b). Autori su takođe istakli da su postigli produktivnost znatno veću od one ostvarene u acilovanju eritritola i manoze korišćenjem reaktora sa pakovanim slojem (148).



(a)

(b)

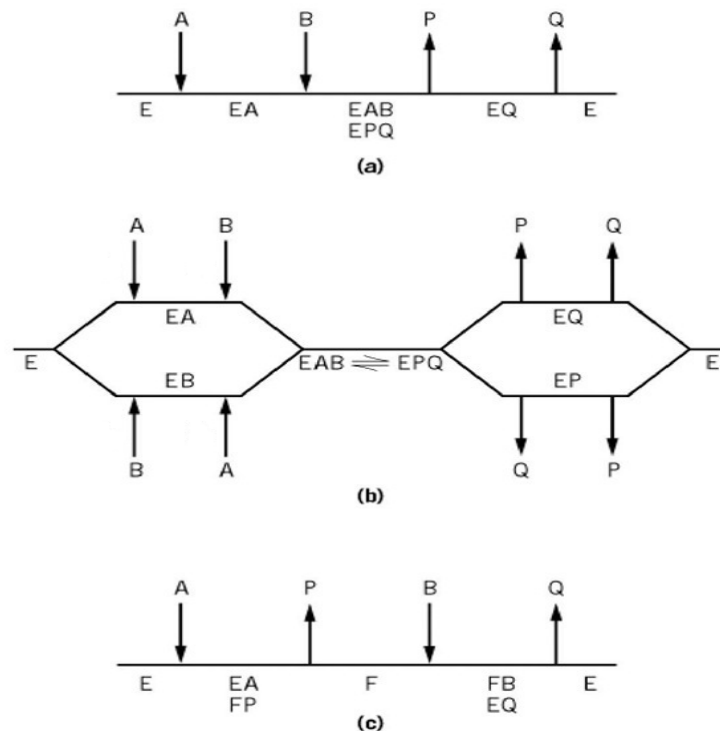
Slika 2.17. (a) Šematski prikaz reaktorskog sistema za kontinualnu proizvodnju acil-askorbata: 1 – rezervoar sa napojnom smešom, 2 – pumpa, 3 – kalem za predgrevanje, 4 – kolona sa L-askorbinskom kiselinom, 5 – kolona sa imobilisanom lipazom Chirazyme® L-2 C2, 6 – termoregulaciona komora, 7 – rezervoar sa efluentom; (b) Odnos vremena zadržavanja i koncentracije askorbil-estara i pad koncentracije proizvoda sa porastom stepena nezasićenosti acil-donora (148).

U bioreaktoru sa pakovanim slojem komercijalnog enzimskog preparata Novozym® 435 redno vezanim sa kolonom u koju su napakovana molekulska sita sintetisana je smeša L-askorbil-estara u reakciji sa svinjskom mašću (150). Kao rastvarač je korišćen *t*-amil alkohol, a reakcioni parametri (radni protok, temperatura i molski odnos supstrata) su optimizovani primenom RSM-a i CCRD-a. Prinos od 50,5 % ostvaren je ne temperaturi od 56,44 °C, molskom odnosu od 1:2,24 i protoku od 1,07 mL min⁻¹. Pad prinosa na višim temperaturama i pri velikim protocima pripisan je termalnoj denaturaciji enzima, odnosno prekratkom vremenu kontakta između lipaze i supstrata, kao i povećanom delovanju smicajnih napona koji dovode do narušavanja trodimenzionalne strukture molekula biokatalizatora. Aktivnost Novozym®-a 435 bila je neumanjena nakon prva tri reakciona ciklusa (ukupno oko 90 h), nakon čega je došlo do naglog pada (38,4 % posle petog ciklusa). S obzirom na dobru rastvorljivost glicerola u *t*-amil alkoholu čije taloženje na česticama biokatalizatora u hidrofobnim medijumima ili sistemima bez rastvarača obično dovodi do male operativne stabilnosti, rezultati koji ukazuju na bržu inaktivaciju lipaze u odnosu na literaturne podatke koji se odnose na isti enzimski preparat i isti rastvarač, nisu do kraja razjašnjeni. Antioksidativna aktivnost smeše estara, merena preko kapaciteta za vezivanje superoksid-anjona i hidrosil-radikala, bila je slična komercijalnom askorbil-

palmitatu i nešto veća od TBHQ. Kada je ispitivano zaštitno dejstvo istih jedinjenja protiv oksidacije svinjske masti i sojinog ulja, TBHQ je pokazao nešto bolje efekte od čistog L-askorbil-palmitata i ispitivane smeše estara.

2.3. Kinetika bisupstratnih enzimskih reakcija

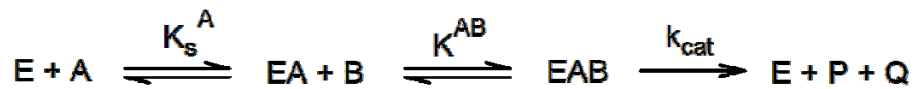
Enzimska kinetika proučava efekat različitih faktora: koncentracije enzima, supstrata i proizvoda, pH, temperature itd., na brzinu enzimске reakcije. Osnovni cilj ovakve analize je definisanje zakona brzine reakcije na osnovu koga se može odrediti vreme odigravanja reakcije i prinos pod definisanim uslovima, što omogućava projektovanje enzimskih reaktora i optimizaciju enzimskih procesa (26). Sinteza estara katalizovana lipazama spada u bisupstratne reakcije. Klilend (Cleland) je bisupstratne reakcije klasifikovao u dve velike kategorije – sekvencijalne i ping-pong (151). Kod reakcija koje se odigravaju prema sekvencijalnom mehanizmu, svi supstrati se vezuju za enzim pre oslobađanja proizvoda, pri čemu se supstrati mogu vezivati uvek istim ili nasumičnim redosledom. Ukoliko se reakcija odigrava prema ping-pong mehanizmu, dolazi do otpuštanja najmanje jednog proizvoda pre nego što se svi supstrati vežu za molekul enzima. Šematski prikaz vezivanja supstrata i otpuštanja proizvoda u dvosupstratnim reakcijama koje se odvijaju prema nabrojanim mehanizmima dat je na slici 2.18.



Slika 2.18. Šematski prikaz vezivanja supstrata i otpuštanja proizvoda u dvosupstratnim reakcijama koje se odvijaju prema: (a) – sekvencijalnom mehanizmu sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata, (b) – sekvencijalnom mehanizmu sa nasumičnim redosledom vezivanja supstrata i (c) – ping-pong mehanizmu (16).

Sinteze estara katalizovane lipazama su bisupstratne reakcije u kojima nastaju dva proizvoda – bi-bi reakcije koje se mogu odvijati po bilo kom od opisanih mehanizama. Ukoliko se pri izvođenju eksperimenata koncentracija jednog supstrata održava konstantnom, svi ovi složeni kinetički modeli svode se na oblik Mihaelis-Mentenove jednačine.

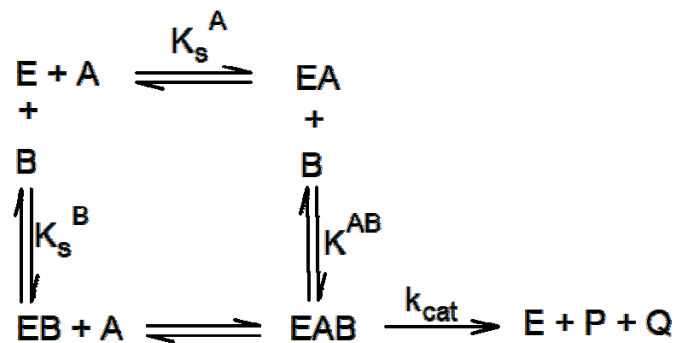
Sekvencijalne bi-bi reakcije sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata



Ovo su reakcije kod kojih se od dva supstrata uvek za aktivni centar enzima prvo vezuje supstrat A, a tek nakon toga supstrat B uz nastajanje ternarnog kompleksa EAB. Kinetički model se izvodi uz pretpostavku o brzom stupnju pri vezivanju jednog od supstrata i pretpostavku o stacionarnom stanju koncentracije kompleksa EAB, i ima sledeći oblik:

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_s^A K^{AB} + K^{AB}[A] + [A][B]}$$

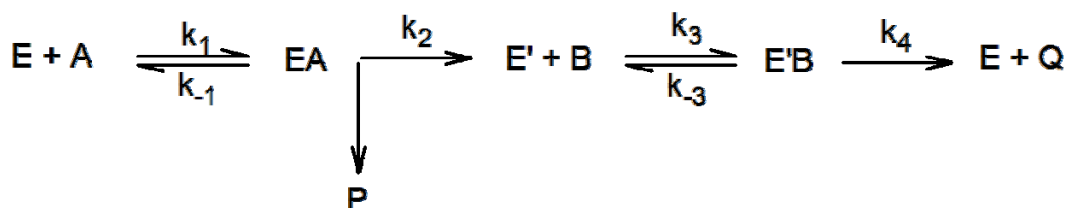
Sekvencijalne bi-bi reakcije sa nasumičnim vezivanjem supstrata



Reakcije ovog tipa se odvijaju tako što se oba supstrata vezuju za enzim pre otpuštanja ijednog proizvoda, a supstrati se ne vezuju uvek istim redosledom. Pri izvođenju kinetičkog modela primenjuju se iste pretpostavke kao i u slučaju reakcija sa pravilnim redosledom vezivanja i na taj način se dolazi do sledećeg oblika:

$$v = \frac{V_{max}[A][B]}{K_s^A K^{AB} + K^{AB}[A] + K^{BA}[B] + [A][B]}$$

Ping-pong bi-bi mehanizam

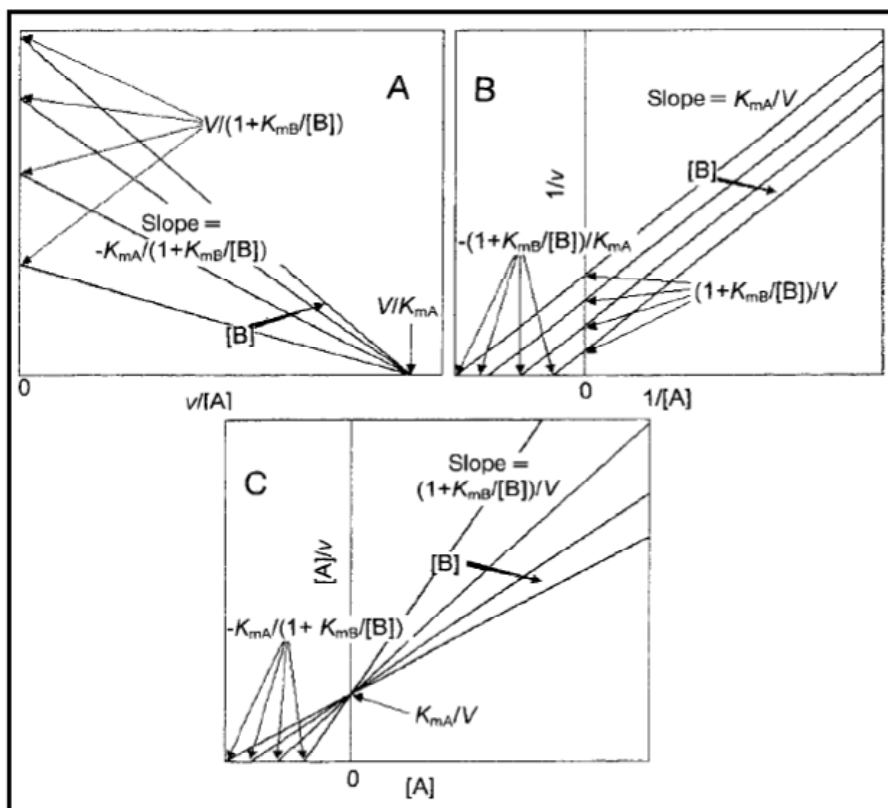


Kod reakcija koje se odvijaju prema ovom mehanizmu, najpre se supstrat A vezuje za enzim formirajući kompleks EA. Nakon toga dolazi do otpuštanja proizvoda P. Zatim se za aktivni centar vezuje supstrat B uz nastajanje kompleksa E'B, koji se razlaže na drugi proizvod – Q i slobodan enzim – E. U ovom slučaju izostaje formiranje ternarnog kompleksa.

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

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

Prikaz linearizovanih formi ping-pong bi-bi reakcionog mehanizma je dat na slici 2.19.



Slika 2.19. Ping-pong reakcioni mehanizam prikazan u: A – Edi-Hofsti (Eadie-Hofstee); B – Lajniver-Burk (Lineweaver-Burk); C – Hejns-Vulf (Hanes-Woolf) dijagramu (152).

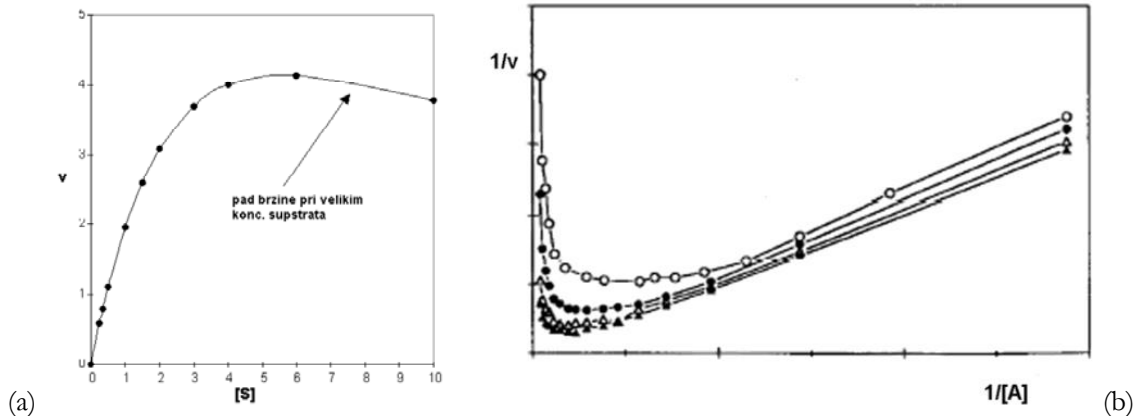
Inhibicija viškom supstrata je veoma česta u reakcijama katalizovanim enzimima, pa i bisupstratnim reakcijama sinteze estara, pri čemu klasični kinetički modeli dobijaju modifikovane oblike (tabela 2.3.)

Tabela 2.3. Kinetički modeli koji uključuju inhibiciju viškom supstrata (16).

Ping-pong bi-bi mehanizam sa inhibicijom alkoholom	$v = \frac{V_{max}[A][K]}{K_m^K[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{i,A}}\right) + \alpha K_m^A[K] + [A][K]}$
Ping-pong bi-bi mehanizam sa inhibicijom kiselinom	$v = \frac{V_{max}[A][K]}{K_m^K[A] + \alpha K_m^A[K] \left(1 + \frac{[K]}{K_{i,K}}\right) + [A][K]}$
Ping-pong bi-bi mehanizam sa inhibicijom alkoholom i kiselinom	$v = \frac{V_{max}[A][K]}{K_m^K[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{i,A}}\right) + \alpha K_m^A[K] \left(1 + \frac{[K]}{K_{i,K}}\right) + [A][K]}$

$\alpha = \frac{k_2}{k_4}$, A – alkohol (ili drugi acil-akceptor), K – kiselina.

Ukoliko se pri izvođenju eksperimenta koncentracija supstrata koji inhibira enzim varira, dok je koncentracija drugog supstrata konstantna, dobija se zavisnost brzine reakcije od koncentracije inhibirajućeg supstrata prikazana na slici 2.20.a. Odgovarajući Lajnriver-Burk dijagram u tom slučaju ima oblik koji nije pravolinijski, već je pri velikim koncentracijama supstrata zakrivljen (slika 2.20.b).



Slika 2.20. Zavisnost brzine reakcije od početne koncentracije inhibirajućeg supstrata pri konstantnoj koncentraciji drugog supstrata (a); karakterističan oblik Lajnriver-Burk dijagrama za slučaj inhibicije supstratom A (b) (16).

2.3.1. Kinetika reakcija sinteze estara katalizovanih lipazama

Reakcije sinteze estara katalizovane lipazom tipa B producenta *C. antarctica* se uglavnom opisuju modelima zasnovanim na ping-pong bi-bi mehanizmu i sekvencijalnom bi-bi mehanizmu sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata (153).

Jadav (Yadav) i Lati (Lathi) su proučavali kinetiku sinteze butil-izobutirata katalizovanu komercijalnim imobilisanim preparatom Novozym[®] 435 (154). Ispitan je uticaj koncentracije oba supstrata na početnu brzinu reakcije. Utvrđeno je da pri povećanju

sadržaja *n*-butanola pri konstantnoj koncentraciji izobuterne kiseline, brzina reakcije raste, dostiže maksimum i nakon određene kritične koncentracije supstrata, opada. Na osnovu ovih rezultata ustanovljeno je da višak alkohola inhibira enzim uz mehanizam koji pretpostavlja da alkohol vezujući se za enzim formira “dead end” kompleks, dok inhibitorno dejstvo kiseline pri većim koncentracijama nije uočeno. Pretpostavljeni ping-pong bi-bi mehanizam sa inhibicijom alkoholom pokazao je veoma dobro poklapanje eksperimentalnih rezultata sa modelom. Određene su vrednosti svih značajnih kinetičkih parametara (v_{max} , K_m^K , K_m^A i $K_{i,A}$). Vrednost Mihaelisove konstante za *n*-butanol je bila niska, što ukazuje na veći afinitet enzima prema ovom reaktantu.

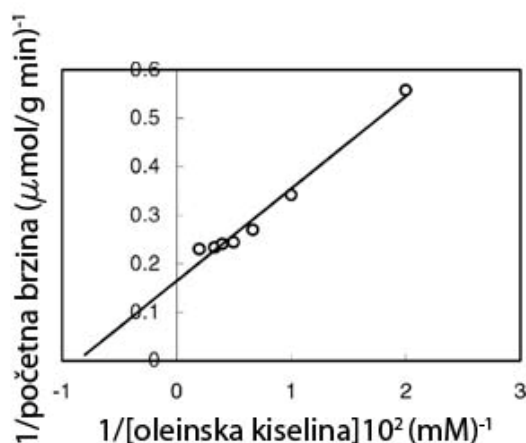
Ova dvojica autora su proučavala i kinetiku reakcije esterifikacije citronelola i laurinske kiseline katalizovanu istim enzimom (144). Preliminarna ispitivanja pokazala su da porast početne koncentracije citronelola dovodi do kontinuiranog rasta početne brzine reakcije, dok je pri variranju koncentracije laurinske kiseline uočeno njeno inhibitorno dejstvo. Kinetika ove reakcije dobro je opisana sekvencijalnim mehanizmom sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata uz inhibitorni efekat kiseline. Pojava inhibicije objašnjena je stvaranjem neaktivnog (“dead end”) kompleksa vezivanjem drugog molekula kiseline za formirani acil-enzim kompleks.

Slični rezultati dobijeni su i u studiji u kojoj je ispitivana kinetika esterifikacije oleinske kiseline i 1-butanola, katalizovane slobodnom lipazom iz *R. miehei* u dvofaznom sistemu u šaržnom reaktoru (155). Ustanovljeno je da se reakcija odvija po ping-pong bi-bi mehanizmu sa inhibicijom alkoholom. Variranje koncentracije butanola, pri konstantnoj koncentraciji donora acil-ostatka, dovodi do rasta početne brzine reakcije do određene koncentracije butanola, a daljim povećanjem koncentracije alkohola dolazi do primetnog pada početne brzine. Prilikom variranja koncentracije oleinske kiseline, pri konstantnoj koncentraciji butanola, ovakav trend nije uočen. Inhibicija alkoholom objašnjena je činjenicom da je u slučaju velike koncentracije 1-butanola u reakcionoj smeši verovatnoća vezivanja molekula alkohola za lipazu pre stvaranja acil-enzim kompleksa velika, pri čemu je ovakav oblik neaktivan i za njega se ne može vezati kiselina.

U nekoliko studija posvećenih ispitivanju kinetike reakcije esterifikacije utvrđeno je da oba supstrata inhibiraju enzim (156, 157). Tako je ustanovljeno da sintezu izoamil-butirata katalizovanu komercijalnim enzimskim preparatom lipaze iz *R. miehei* inhibiraju i izoamil alkohol i buterna kiselina, a da se eksperimentalni rezultati najbolje fituju ping-pong bi-bi

mehanizmom (156). Na osnovu dobijenih konstanti modela, zaključeno je da je inhibitorno dejstvo kiseline intenzivnije i da je afinitet enzima prema oba supstrata jednak. Grupa autora je ispitivala kinetiku reakcije esterifikacije glukoze masnim kiselinama – laurinskom, palmitinskom i stearinskom, katalizovane komercijalnim imobilisanim preparatom CAL B – Novozym[®] 435 u acetonu (158). Eksperimentalni rezultati su fitovani modelima izvedenim iz pretpostavljenog ping-pong bi-bi mehanizma sa uključenim efektom deaktivacije enzima u toku vremena. Određeno je da energija aktivacije limitirajućeg stupnja reakcije (formiranje acil-enzim kompleksa) sa laurinskom kiselinom kao donorem acil-ostatka iznosi 12 kcal mol⁻¹. Utvrđeno je i da sa povećanjem dužine lanca masne kiseline, početna brzina esterifikacije raste.

Temeljna kinetička ispitivanja enzimske sinteze estara L-askorbinske kiseline su izostala u dostupnoj literaturi, a nekoliko je studija u kojima su predloženi kinetički modeli koji opisuju proces. Song i Vei su u okviru istraživanja posvećenom biosintezi askorbil-oleata u kome je korišćena lipaza iz *Candida* sp. imobilisana na silikatnoj zemlji, pretpostavili da se reakcija esterifikacije odvija prema ping-pong bi-bi mehanizmu sa uključenom inhibicijom vitaminom C (125). Izvođenjem eksperimenta pri konstantnoj koncentraciji askorbinske kiseline određene su vrednosti maksimalne početne brzine ($V_{max} = 6,1 \mu\text{mol min}^{-1}$) i prividne Mihaelisove konstante ($K'_m = 116 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 2.21).



Slika 2.21. Lajniver-Burk dijagram pri konstantnoj koncentraciji vitamina C u sintezi askorbil-oleata (125).

Pod pretpostavkom da je pri primenjenoj koncentraciji od 0,3 M vitamina C reakciona smeša zasićena ovim supstratom, pa se njegova koncentracija može smatrati konstantnom, reakcija sineze njegovih lauril- i palmitil-estara pri ekvimolarnim uslovima modelovana je

kao monosupstratna reakcija (159). Rezultati su pokazali da se nešto veće maksimalne brzine postižu sa aktiviranim acil-donorima (metil- i etil-estrima) nego sa samim kiselinama, kao i da su u tom slučaju vrednosti Mihaelisovih konstanti manje.

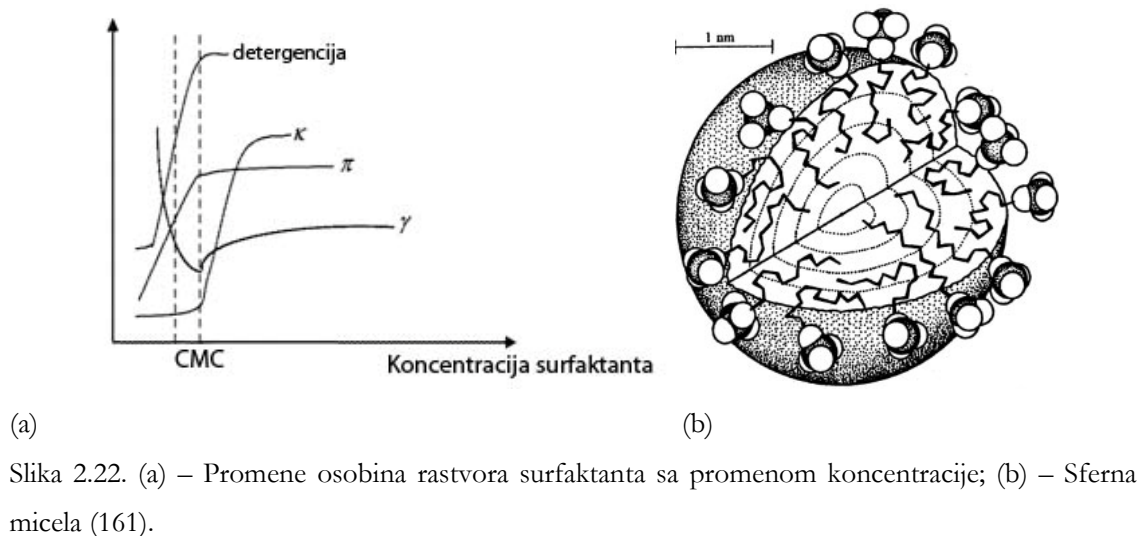
Druga grupa autora je analizirala kinetiku sinteze L-askorbil-acetata iz vinil-acetata i vitamina C katalizovanu Novozym[®]-om 435 i Lipozyme[®]-om TL-IM u acetonu (52). Pretpostavljeno je da se reakcija može opisati običnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom, s obzirom na to da je acil-donor bio prisutan u velikom višku (5:1). Poređenjem kinetičkih konstanti za dva enzimska preparata, zaključeno je da primena Lipozyme[®]-a TL-IM omogućava ostvarivanje većih maksimalnih brzina reakcije, dok je afinitet Novozym[®]-a 435 prema supstratu bio veći. Ova grupa autora je istu reakciju, katalizovanu Lipozyme[®]-om TL-IM, izvodila i u okviru svoje naredne studije, i tada je predložen ping-pong bi-bi model sa inhibicijom vitaminom C (160). Utvrđeno je da su efekti inhibicije manji na višim temperaturama.

2.4. Primena askorbil-estara karboksilnih kiselina

2.4.1. Askorbil-estri karboksilnih kiselina kao surfaktanti

2.4.1.1. Surfaktanti

PAM (površinski aktivne materije, surfaktanti) su amfifilni molekuli sastavljeni iz nepolarnog, hidrofobnog dela (C 8-18 lanac) i hidrofilnog, polarnog nejonskog ili jonskog dela, što im daje karakteristične osobine (akumulacija na granici faza, asocijacija u rastvorima) (161). Prema prirodi hidrofilne grupe, mogu se podeliti na anjonske, katjonske, amfoterne i nejonske. Pokretačka sila za njihovu adsorpciju na granici faza je snižavanje slobodne energije granice faza po jedinici površine tj. površinskog napona (mJ m^{-2}), a stepen adsorpcije zavisi od strukture same površinski aktivne materije i osobina obe faze. Pokretačka sila za micelizaciju je smanjivanje kontaktne površine između ugljovodoničnog lanca i vode (ili hidrofilnog dela i ulja), čime se snižava slobodna energija sistema. Upotrebljavaju se u industriji deterdženata, boja, agrohemikalija, plastike, ulja, kozmetičkoj, farmaceutskoj, prehrambenoj, itd. (161).



Osnovna razlika u odnosu na rastvore molekula koji nisu amfifilni i čije su dimenzije manje, jeste nagla promena osobina iznad određene kritične koncentracije (slika 2.22.a). Pri niskim koncentracijama, jedino se površinski napon menja sa porastom koncentracije drugačije u odnosu na rastvore običnih elektrolita (naglo pada do kritične koncentracije). Pri koncentracijama većim od kritične, sve osobine rastvora se naglo menjaju jer tada dolazi do asocijacije molekula u, uglavnom sferne, agregate (micele) (slika 2.22.b).

Koncentracija pri kojoj dolazi do ovog fenomena se naziva kritična micelarna koncentracija (CMC – critical micellar concentration), karakteristika je svake PAM na određenoj temperaturi i pri određenoj koncentraciji elektrolita, i vrednost površinskog napona tada ima prelomnu tačku, nakon koje ostaje gotovo konstantna (CMC se najčešće određuje merenjem površinskog napona, a na raspolaganju su još neke tehnike: NMR, određivanje koeficijenta samodifuzije, fluorescentna spektroskopija) (161).

HLB (hydrophilic-lipophilic balance) broj pokazuje koliko je neka PAM hidrofilna odnosno hidrofobna tj. koliki je relativni udeo hidrofilnih u odnosu na lipofilne grupe u molekulu (161). Prema Grifinu (Griffin), HLB broj se računa na sledeći način, tako da može imati vrednosti od 0 do 20:

$$HLB = 20 \frac{M_h}{M}$$

gde je M_h - molarna masa hidrofilnog dela i M - molarna masa celog molekula.

HLB = 0 znači da je molekul potpuno hidrofoban, dok HLB = 20 ukazuje na to da je molekul sastavljen samo iz hidrofilnih komponenti. Ukoliko je HLB < 10 to je liposolubilna PAM, a ako je HLB > 10, hidrosolubilna. Surfaktanti čiji su HLB brojevi u definisanom opsegu, mogu se, u zavisnosti od toga, upotrebljavati u određene svrhe (HLB = 4-8: antipenušavac; HLB = 7-11: za W/O (water/oil - voda u ulju) emulzije; HLB = 11-14: za kvašenje; HLB = 12-16: za O/W (oil/water - ulje u vodi) emulzije; HLB = 12-15: za deterdžente; HLB = 16-20: kao solubilizatori i hidrotropi (rastvaraju hidrofobne supstance u vodenom medijumu, hidrofobni lanac nedovoljno veliki za formiranje micela)).

Nešto kasnije je Dejvis (Davies) predložio metodu određivanja HLB broja koja uzima u obzir različit doprinos različitih hidrofilnih grupa i koja se zasniva na primeni sledeće jednačine (162):

$$HLB = 7 + \sum_{i=1}^m H_i - 0,475 n$$

pri čemu je m broj hidrofilnih grupa u molekulu, H vrednost pojedinačne grupe (tabelarna vrednost) i n broj lipofilnih grupa u molekulu.

2.4.1.2. Mogućnost primene askorbil-estara kao surfaktanata

Askorbil-estri masnih kiselina kao amfilni derivati prirodnih jedinjenja mogu se koristiti kao pogodna zamena za klasične nejonske površinski aktivne materije dobijene iz petrohemijskih sirovina. Estri vitamina C dobijeni enzimskom katalizom svrstavaju se u

red obnovljivih i ekoloških proizvoda, pa je u određenom broju publikacija ispitivana i mogućnost upotrebe ovih jedinjenja kao surfaktanata.

U istraživanju u kome je ispitivana mogućnost upotrebe sintetisanih estara (askorbil-oleata i askorbil-palmitata) kao emulgatora, praćen je uticaj njihove koncentracije na površinski napon (50). Da bi se surfaktant ponašao kao emulgator, on mora da poseduje veliku površinsku aktivnost i da stvara mali površinski napon u sistemu u kome treba da se upotrebi. To znači da treba da pokazuje tendenciju da migrira ka granici faza, veću nego da ostaje rastvoren u jednoj od dve faze sistema. Oba jedinjenja su pokazala odlične osobine kao površinski aktivne materije. Grafičkom metodom, na osnovu prevojne tačke na krivoj koja opisuje zavisnost površinskog napona od logaritma koncentracije, određena je i minimalna koncentracija estara potrebna za formiranje micela (CMC). U slučaju askorbil-oleata, došlo je do krivljenja u oblasti prelomne tačke uz formiranje minimuma, što je najčešće uzrokovano prisustvom nečistoća, čak i u veoma niskim koncentracijama. Utvrđeno je da je opseg u kome se kretala dobijena vrednost (0,1-0,3 mM) u saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja - 0,22 mM na 25 °C (142). CMC askorbil-palmitata bila je relativno bliska – 0,1 mM, ali je njegova rastvorljivost u vodi bila znatno niža u odnosu na askorbil-oleat, što je u skladu sa činjenicom da je zasićeni C16 alkil-lanac manje rastvoran od C18 nezasićenog. Sa druge strane, površinski napon koji odgovara CMC je bio viši u slučaju palmitata (32 mN m⁻¹), dok je za oleat imao nešto nižu vrednost (26-27 mN m⁻¹), što ukazuje na to da je askorbil-oleat efikasniji kao emulgator. Autori su skrenuli pažnju i na mogućnost korišćenja estara vitamina C kao prirodnih amfifilnih molekula u cilju solubilizacije i stabilizacije farmaceutski aktivnih molekula (163).

Kuvabara i sar. su vršili poređenje osobina askorbil-estara kaprinske i laurinske kiseline kao surfaktanata merenjem površinskih napona njihovih vodenih rastvora na različitim temperaturama (148). Utvrđeno je da CMC ni za jedan od dva estra ne zavisi značajno od temperature, kao i da recipročna vrednost viška površinske koncentracije ($a = 1/I$) iznosi 0,35 nm² za oba jedinjenja u čitavom opsegu ispitivanih temperatura (30-45 °C). Ispitan je i uticaj pH vrednosti sredine na površinski napon rastvora askorbil-estra kaprinske kiseline na 30 °C. Na višim pH vrednostima, CMC je bila veća (eksponencijalna zavisnost), što su autori objasnili povećanjem stepena disocijacije sa porastom pH. Vrednost parametra a je ostala nepromenjena, i ustanovljeno je da pH rastvora nema efekat na ovu veličinu. Na osnovu toga je zaključeno da je najverovatnija orijentacija molekula askorbil-estra takva da

su acil-ostaci okrenuti ka vazduhu i da a vrednosti zavise isključivo od askorbil dela molekula.

Emulgujuća moć L-askorbil-estara karboksilnih kiselina ispitivana je u još nekoliko studija (164, 165). Kuvabara i sar. su dokazali da su L-askorbil-kaprinat i -laurat dobri emulgatori (164). Kada je analizirana sposobnost emulgovanja sojinog ulja u vodi od strane serije estara vitamina C i to u kiseloj, neutralnoj i baznoj sredini, pokazano je da dobra emulgujuća svojstva poseduju svi estri sa više od osam C atoma u bočnom nizu kao i da je njihova emulgujuća aktivnost najveća u kiselim uslovima sredine (165). L-askorbil-estri su bili bolji emulgatori od sojinog lecitina i gume arabike i slabiji od lecitina iz žumanceta jajeta. Među svim testiranim estrima, askorbil-oleat se pokazao kao najpotentniji emulgator.

2.4.2. Askorbil-estri karboksilnih kiselina kao antioksidansi

2.4.2.1. Antioksidansi

Atomi, joni i molekuli koji u svojoj strukturi imaju jedan ili više nesparenih elektrona nazivaju se slobodni radikali. Upravo nespareni elektron slobodnih radikala uzrokuje njihovu visoku i neselektivnu reaktivnost i nestabilnost. Ove osobine svojstvene su i nekim neradikalnim vrstama - oksidacionim sredstvima koja lako prelaze u slobodne radikale. Reaktivni slobodni radikali mogu nastati u brojnim reakcijama koje se mogu svrstati u četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcione procese i visokoenergetsko zračenje (166). Slobodni radikali su produkti brojnih procesa u biosistemima – apsorpcije zračenja, oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, fagocitoze, biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, metabolizma etanola, enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom i lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina. Stabilnost slobodnih radikala prvenstveno zavisi od sposobnosti preostalog dela molekula da stabilizuje nespareni elektron, pri čemu su rezonancija i sterna efekat dva osnovna faktora koji utiču na tu stabilnost. Delokalizacija nesparenog spina povećava stabilnost radikala i omogućava reagovanje preko više različitih položaja. Vreme poluživota slobodnih radikala zavisi i od sternog zaklanjanja centra radikala, ili celine radikala, od strane velikih supstituisanih grupa koje se nalaze u okolini i ometaju reakcije radikal-radikal ili reakcije

slobodnih radikala sa nekim supstratom. Ukoliko ne postoji mogućnost stabilizacije (npr. delokalizacija ili sterne smetnje), oni se brzo razlažu.

U ljudskom organizmu postoji ravnoteža između stvaranja reaktivnih oblika kiseonika i ostalih slobodnih radikala i njihove inaktivacije antioksidativnim sistemima organizma. Pomeranje ove ravnoteže ka stvaranju viška slobodnih radikala naziva se oksidativni stres i posledica je pada imuniteta sistema prouzrokovanog stresom ili različitim oboljenjima. Oksidativni stres dovodi do oštećenja osnovnih biomolekula organizma: DNK, proteina i lipida. Prema mestu nastajanja, antioksidansi značajni za ljudski organizam, dele se na endogene i egzogene. Pored fenolnih jedinjenja, vitamina E, karotenoida (β -karoten), oksikarotenoida (likopen) itd., među najznačajnije egzogene antioksidanse spada i L-askorbinska kiselina.

Antioksidansi se mogu definisati kao supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata (167). Antioksidansi deluju kao “hvatači” slobodnih radikala, tj. deluju kao donori elektrona ili H atoma peroksil- ili hidrokstil- radikalima ili kao akceptori elektrona ili H atoma ugljenikovih slobodnih radikala, kompleksiraju jone metala, razgrađuju hidroperoksid, eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika, pokazuju sinergetske efekte, itd (166).

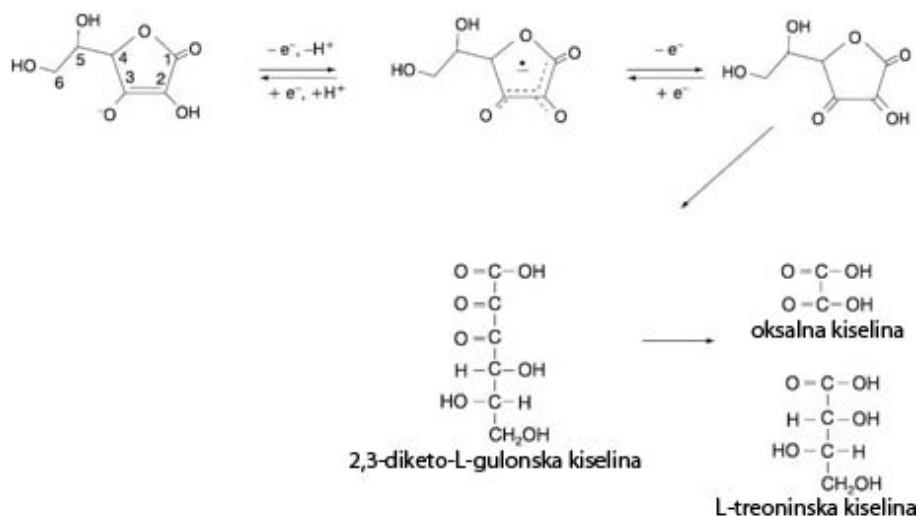
2.4.2.2. Vitamin C kao antioksidans

Vitamin C je veoma rasprostranjen u prirodi, pa se tako nalazi u svim tkivima živih organizama gde ima značajnu metaboličku funkciju. U većoj meri je zastupljen u voću i povrću (pomorandžama, limunu, peršunu, borovnicama, zelenoj paprici, itd.), dok ga u životinjskim tkivima ima znatno manje. Predstavlja slabu kiselinu ($pK_a=4,2$) koja zbog svoje endiolne strukture gubitkom elektrona može biti reverzibilno oksidovana do askorbil-radikala. U poređenju sa ostalim radikalskim vrstama, relativno je stabilan, i daljom oksidacijom prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu koja *in vivo* verovatno postoji u više oblika i može biti redukovana nazad do L-askorbinske kiseline istim putem (168).

Vitamin C je značajan antioksidans, koji sprečava oksidaciju drugih jedinjenja. Funkcioniše kao “hvatač” tokoferokstil-radikala, prevodeći ga u vitamin E i omogućavajući tokoferolu da vrši svoju antioksidativnu funkciju (169). L-askorbinska kiselina je specifični elektron-donor osam enzima uključenih u biosintezu kolagena, karnitina i noradrenalina, amidaciju peptidnih hormona i metabolizam tirozina. Takođe se ponaša i kao redukciono sredstvo

koje neenzimskim putem učestvuje u brojnim hemijskim reakcijama. Iako se kao hidrosolubilna supstanca lako izbacuje iz organizma, vitamin C se koncentriše u brojnim organima (170). Najveće koncentracije nalaze se u nadbubrežnoj žlezdi, gde je L-askorbinska kiselina neophodna za biosintezu kateholamina i nadbubrežnu steroidogenezu (171). Kada se unosi oralnim putem, vitamin C se dobro apsorbuje u niskim dozama, dok se apsorpcija sa porastom unete količine smanjuje, a u urinu se pojavljuje pri unošenju preko 100 mg na dan (170).

Vitamin C se kroz ćelijske membrane, kako se pretpostavlja, prenosi posredstvom dva mehanizma. Askorbinska kiselina se veoma lako oksiduje do dehidroaskorbinske kiseline, koju ćelija brzo preuzima i prevodi do askorbinske kiseline, koristeći glutation za redukciju (172). Ovaj proces naziva se i “recikliranje askorbata”, s obzirom na to da predstavlja intracelularno recikliranje ekstracelularno oksidovanog askorbata. Transport dehidroaskorbinske kiseline odvija se posredstvom transportera GLUT1 i GLUT3, s obzirom na sličnost sa molekulom glukoze (173). S druge strane, askorbinska kiselina se može unositi u ćeliju i putem transportnog mehanizma u kome učestvuju transporteri SVCT1 i SVCT2, čije je dejstvo zavisno od jona natrijuma. U zavisnosti od pH sredine i oksidacionog stanja, vitamin C se javlja u više različitih formi (8). Pod fiziološkim uslovima, 99,95 % vitamina C nalazi se u obliku askorbat monoaniona tj. “askorbata” (8).



Slika 2.23. Degradacija askorbata (174).

Prilikom interakcije askorbata sa reaktivnim radikalima ili lipidnim hidroperoksidima, oslobađa se jedan elektron iz askorbata i formira se askorbil-radikal koji je mnogo manje reaktivan. Askorbil-radikal, sa druge strane, podleže reakciji u kojoj se regeneriše deo

askorbata i formira dehidroaskorbinska kiselina, koja se, usled nestabilnosti, brzo razgrađuje, dajući oksalnu i L-treoninsku kiselinu za krajnje proizvode (slika 2.23.) (174).

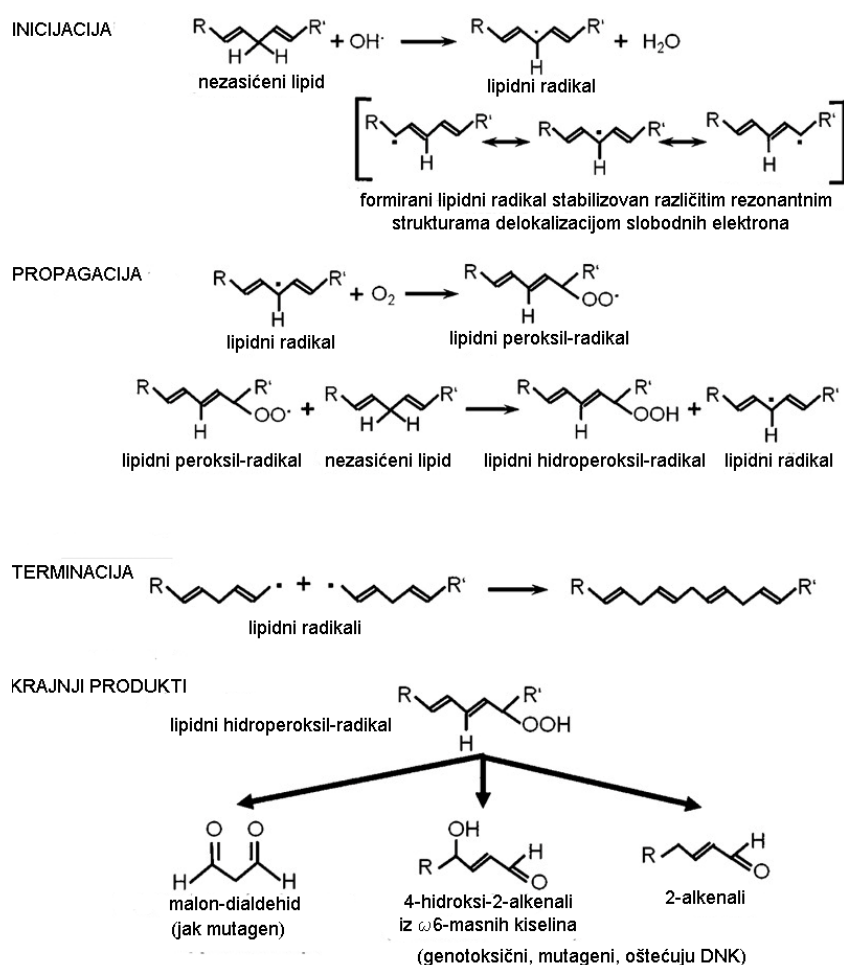
Mikronutrijenti i enzimi koji poseduju antioksidativnu aktivnost predstavljaju odbrambeni sistem organizma u borbi protiv slobodnih radikala i reaktivnih molekula. Kontinualno stvaranje visokoreaktivnih kiseoničnih metabolita je deo normalnog ćelijskog metabolizma, a u slučaju patoloških uslova, ovaj proces se višestruko ubrzava (175). Međutim, u slučajevima gde je šteta izazvana oksidativnim procesima već nastala, antioksidansi mogu imati i prooksidativno dejstvo (što je antioksidans jače redukciono sredstvo, veća je mogućnost štetnog dejstva) (176). U skladu sa tim, u literaturi se mogu naći različite informacije o povezanosti oksidacije makromolekula i unošenja velikih količina vitamina C. Ima istraživanja čiji rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu vitamina C u oksidaciji DNK (177, 178), dok drugi autori prijavljuju prooksidativno i antioksidativno dejstvo kod zdravih osoba (179). U pojedinim radovima se javljaju i tvrđenja da veće doze vitamina C ne utiču ni na jedan od pomenutih procesa (180, 181). Poznato je da deficit nekih vitamina i minerala, pa i L-askorbinske kiseline, dovodi do oštećenja DNK (182). Međutim, sposobnost vitamina C da u *in vitro* uslovima oštećuje DNK, lipide i proteine, pripisuje se njegovom učešću u formiranju reaktivnih kiseoničnih vrsta (superoksid-anjon-radikala, vodonik-peroksida ili hidroksil-radikala) u prisustvu jona prelaznih metala u tragovima (183, 184).

Hidroksil-radikal, jedan od najpotentnijih slobodnih radikala, može da inicira proces lipidne peroksidacije, izazove oštećenja DNK lanca i, generalno, poseduje potencijal da oksiduje bilo koji organski molekul (185, 186). Kod pacova kod kojih je hemijskim putem indukovano nastajanje hidroksil-radikala, tretmanom vitaminom C suzbijeno je njihovo stvaranje (187). Kod zdravih ljudi, koji su uzimali gvožđe i vitamin C kao ko-suplemente, privremeno je povećano oksidativno oštećenje DNK, nakon koga je usledila normalizacija, najverovatnije usled adaptacije ćelija (188). U slučaju oksidativnog stresa izazvanog visokim unosom gvožđa ishranom, vitamin C ne dovodi do daljeg intenziviranja procesa (189).

2.4.2.3. Mogućnost primene askorbil-estara kao antioksidanasa

L-askorbinska kiselina sve više dobija na značaju kao prirodni aditiv pri čemu je, pored svoje vitaminske funkcije, značajan sekundarni antioksidans, koji deluje kao “hvatač” kiseonika, sinergist sa helatorima i regenerator primarnih antioksidanasa. Vitamin C se veoma često upotrebljava za prezerviranje prehrambenih, kozmetičkih i farmaceutskih

proizvoda, pri čemu se može koristiti sam ili u kombinaciji sa sinergistima (npr. vitaminom E) (11). S obzirom na svoju hidrofilnu prirodu, vitamin C ne može biti upotrebljavan kao efikasan “hvatač” slobodnih radikala u proizvodima sa visokim sadržajem lipida, kod kojih usled procesa lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina (slika 2.24.) u toku uobičajenog načina čuvanja, dolazi do kvarenja (javlja se užeglost) (14). Međutim, askorbil-estri masnih kiselina, kao liposolubilni derivati vitamina C sa dokazanom antioksidativnom aktivnošću koji se pod fiziološkim uslovima razlažu do L-askorbinske i masne kiseline bez formiranja bilo kakvih štetnih produkata, mogu se uspešno koristiti kao aditivi u lipofilnim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima.



Slika 2.24. Lipidna peroksidacija (u toku faze inicijacije, lipidni radikal je stabilizovan različitim rezonantnim strukturama delokalizacijom slobodnog elektrona; u fazi propagacije lipidni radikal reaguje sa molekulskim kiseonikom formirajući lipidni peroksil-radikal koji propagira reakciju putem radikalske lančane reakcije; u fazi terminacije dva lipidna radikala reaguju međusobno formirajući stabilnu vezu, a pored toga, iz lipidnog hidro-peroksida nastaje serija mutagenih i genotoksičnih krajnjih degradacionih produkata) (190).

Rejes-Duarte (Reyes-Duarte) i sar. određivali su antioksidativna svojstva sintetisanih askorbil-derivata palmitinske i oleinske kiseline korišćenjem TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity) testa (50). Ustanovljeno je da dodavanje acil-ostatka u 6-OH položaju L-askorbinske kiseline dovodi do pada početne antioksidativne aktivnosti (za sam vitamin C), i to na 84 % i 71 %, u slučaju palmitata i oleata, redom. Napravljen je i osvrt na značaj uticaja primenjene metode određivanja na izvedene zaključke, što je i uzrok za postojanje raznolikih informacija u rezultatima objavljenih istraživanja. Tako je u drugoj studiji ubrzani test oksidabilnosti (Rancimat test) sproveden u cilju određivanja oksidativne stabilnosti sojinog ulja u prisustvu askorbil-estara masnih kiselina pokazao da oba estra (palmitat i oleat) povećavaju stabilnost u odnosu na formiranje peroksida za oko 20 % (191). Oni su utvrdili da askorbil-estri vitamina C imaju isto ili čak poboljšano fiziološko dejstvo i antioksidativnu aktivnost (mereno DPPH metodom) u poređenju sa L-askorbinskom kiselinom. Takođe je pokazano da askorbil-oleat ima bolji zaštitni efekat na venske endotelne ćelije iz pupčane vrpce nego drugi derivati vitamina C (135).

Viklund i sar. pratili su uticaj askorbil-palmitata i oleata na usporavanje procesa stvaranja peroksida u repičinom ulju u toku 18 nedelja, pri čemu je estar oleinske kiseline pokazao znatno veću efikasnost. Antioksidativna dejstva askorbil-oleata dobijenog u enzimskoj reakciji i askorbil-palmitata proizvedenog komercijalnim sintetskim postupkom, upoređena su dodavanjem 600 mg jednog ili drugog jedinjenja jednom kilogramu svežeg, dezodorisanog ulja uljane repice sa niskim sadržajem eručne kiseline (46). Masnokiselinski sastav ulja bio je 58,5 % oleinske, 21,5 % linolne, 10,5 % linolenske, 4,5 % palmitinske i 1,5 % stearinske kiseline, a sadržaj tokoferola iznosio je 200 ppm α -, 320 ppm γ - i 7 ppm δ -tokoferola. Eksperiment je izvođen na 30 i 40 °C, na tamnom, a uzorci su analizirani nakon različitih vremenskih intervala, određivanjem peroksidnog broja standardnom titrimetrijskom metodom. Na obe ispitivane temperature, askorbil-oleat je pokazao bolja svojstva od palmitata. U uzorcima u koje je dodat estar palmitinske kiseline nakon nekoliko nedelja je detektovan porast peroksidnog broja, iako manji nego u kontroli (bez dodatog antioksidansa), dok je do ubrzanog stvaranja peroksida u slučaju oleata došlo tek nakon 4 nedelje na 40 °C i nakon 9 nedelja na 30 °C. Askorbil-estri su pokazali i sinergističko dejstvo sa tokoferolima, pa je tako nakon 10 nedelja na 40 °C u kontrolnom uzorku sadržaj tokoferola pao na nulu, upotrebom palmitata sačuvano je 3 % γ -tokoferola, a ulje zaštićeno oleatom zadržalo je 57 % γ -tokoferola i 86 % δ -tokoferola. Ova dva testa

nedvosmisleno su pokazala da je askorbil-oleat, kada se koristi kao antioksidans u uljima, mnogo bolji izbor od askorbil-estra palmitinske kiseline.

Vatanabe i sar. su ispitali sposobnost nezasićenih askorbil-estara dobijenih enzimskim putem da suzbiju autooksidaciju polinezasićenih masnih kiselina (PMK), kao nutritivno veoma vrednih, ali nestabilnih sastojaka prehrambenih proizvoda (146). Najpre je autooksidacija nemodifikovanih PMK (linolne, α -linolenske, γ -linolenske, arahidonske i dokosaheksaenske) i njihovih askorbil-estara praćena na 65 °C i pri relativnoj vlažnosti bliskoj 0 %. Same kiseline bile su oksidovane za 5 h gotovo u potpunosti (izuzev linolne kod koje je do kompletne autooksidacije došlo nakon jednog dana), dok su odgovarajući estri bili otporni na autooksidaciju (90 % i više svakog od derivata ostalo je stabilno u toku čitavog vremena ispitivanja). Nakon toga, ispitan je uticaj dodavanja samog vitamina C i askorbil-linolata na stabilnost linolne kiseline pod uslovima koji su primenjeni i u prvom delu istraživanja. Dobijeni su slični rezultati: dodavanje oba antioksidansa u odnosu 1:5 prema kiselini suzbilo je gotovo u potpunosti autooksidaciju linolne kiseline u toku najmanje 20 h. Isti uticaj na stabilnost dokosaheksaenske kiseline (pod istim uslovima u toku 6 h) pokazao je askorbil-laurat dodat u istom odnosu prema kiselini.

Oksidativna stabilnost sojinog ulja merena je u prisustvu L-askorbil-estara masnih kiselina praćenjem povećanja koncentracije konjugovanih diena i triena nakon 20 dana čuvanja na 70 °C (165). Pokazano je da estri poseduju jače antioksidativno dejstvo od same L-askorbinske kiseline, kao i da sa povećanjem broja C atoma tj. lipofilnosti antioksidansa raste i njegovo protektivno delovanje. Takođe je bolji rezultat postignut sa oleatom u poređenju sa stearatom, što pokazuje da visoka hidrofobnost nije jedini parametar čije povećanje dovodi do poboljšanja antioksidativnih karakteristika L-askorbil-estara u lipofilnim medijumima.

Grupa autora je testirala sposobnost serije L-askorbil-estara da inhibiraju peroksidaciju humanih lipoproteina male gustine (low density lipoprotein – LDL). Kod zdravih osoba se oko 70 % ukupnog holesterola prenosi posredstvom LDL-a, dok pri povišenim vrednostima LDL dovodi do ateroskleroze koja povećava rizik od pojave srčanog i moždanog udara. Peroksidacija je indukovana hidrosolubilnim inicijatorom 2,2'-azobis(2,2-amidinopropan-hidrohloridom) i bakrom i inhibirana vitaminom C i njegovim lipofilnim derivatima (askorbil-kaprilatom, -lauratom i -palmitatom), a dobijeni rezultati su obećavajući. Sva testirana jedinjenja su pokazala sinergističko dejstvo sa endogenim antioksidansima (vitaminom E, koenzimom Q10, β -karotenom, itd.), pri čemu je

sinergistički efekat estara bio znatno jači. Takođe je utvrđeno da je inhibitorno delovanje vitamina C, a naročito lipofilnih derivata intenzivnije u slučaju peroksidacije LDL-a indukovane bakrom (192).

2.4.3. Ostala fiziološka dejstva L-askorbil-estara karboksilnih kiselina

Pored svoje osnovne funkcije koju imaju kao lipofilni antioksidansi i amfifilnog karaktera koji im omogućava primenu kao površinski aktivnih materija, u novijim istraživanjima su uočena i neka dodatna svojstva L-askorbil-estara karboksilnih kiselina čime su otvorena brojna nova potencijalna polja njihove primene.

S obzirom na sve veću zabrinutost koju izazivaju brojni problemi povezani sa upotrebom antibiotika, sve je veće interesovanje za otkrivanje novih molekula sa antimikrobnim osobinama. Tako je grupa autora ispitala antimikrobno dejstvo serije askorbil-estara protiv Gram-pozitivnih (*Bacillus cereus* (BC), *Bacillus subtilis* (BS), *Brevibacterium flavum* (BF), *Micrococcus luteus* (ML), *Staphylococcus xylosus* (Sx), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (SEp), *Enterococcus faecalis* (EF) i *Enterococcus faecium* (EFa)) i Gram-negativnih (*Enterobacter cloacae* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (Ps), *Salmonella typhimurium* (STyphi), *Klebsiella pneumonia* (KP) i *Echerichia coli* (Ecoli)) bakterija određivanjem minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije (165). Testirani su vitamin C, kao i smeše vitamina C sa masnim kiselinama i sintetisani estri. Pokazano je da vitamin C daje inhibitorni efekat tek pri koncentracijama većim od 4 mg mL⁻¹ i da su inhibitorne i baktericidne koncentracije njegove smeše sa masnim kiselinama nešto niže, dok estri kao njihovi derivati poseduju značajno jače antimikrobno dejstvo u poređenju sa L-askorbinskom kiselinom, naročito protiv Gram-pozitivnih bakterija. Tako su se MIC estara protiv G(+) bakterija kretale od 0,0625 do 2 mg mL⁻¹, dok su kod G(-) bile između 0,5 i 4 mg mL⁻¹. Manja osetljivost G(-) bakterija na testirana jedinjenja je u skladu sa rezultatima dobijenim sa različitim polifenolima. Pokazano je da se esterifikacijom vitamina C njegova antimikrobna aktivnost znatno povećava, a da je poboljšanje najveće ukoliko se radi o estrima srednje dužine bočnog niza (C10 i C12). Autori su svoje rezultate uporedili sa rezultatima dobijenim za tirozol estre koji su samo u slučaju lipofilizacije masnim kiselinama srednje dužine lanca pokazivali antibakterijsku aktivnost, naročito protiv *Staphylococcus* vrsta. Objasnjeno je da njihova umerena hidrofobnost omogućava da participiraju u lipidima ćelijskih zidova bakterija pri čemu oni postaju permeabilniji i dolazi do curenja jona i drugih ćelijskih konstituenata. Navedeno je i da ovi molekuli mogu da

uđu u ćeliju i da interaguju sa nekim metaboličkim mehanizmima, čime je objašnjeno njihovo bakteriostatsko delovanje. U istoj studiji ispitano je i delovanje sintetisanih estara protiv lajšmanijaze, s obzirom na neophodnost traganja za alternativnim terapijskim rešenjima zbog sve prisutnije rezistentnosti na petovalentni antimon. Testirano je dejstvo protiv dve vrste: *Leishmania major* GLC94 i *Leishmania infantum* LV50. Pokazalo se da među svim ispitivanim estrima (C2-C18) samo tri jedinjenja poseduju aktivnost protiv obe vrste i to askorbil-kaprinat (C10), laurat (C12) i oleat (C18:1). Svi molekuli bili su efikasniji protiv *L. major*, a redosled aktivnosti bio je sledeći: C18:1>C12>C10.

Mnoge dodatne osobine koje otvaraju nova potencijalna polja primene askorbil-estara masnih kiselina, naročito u medicinske svrhe, a koje proističu iz njihovih antioksidativnih svojstava i lipofilnosti, utvrđene su u brojnim publikacijama. Kada je ispitivano hemopreventivno dejstvo askorbil-palmitata protiv kancera debelog creva kod muških F344 pacova indukovano azoksimetanom, primenjivano je 40 i 80 % maksimalne tolerabilne doze u ishrani (MTD=5000 ppm) (193). Askorbil-palmitat je uveden u ishranu pre i u toku izazivanja karcinogeneze i praćen je uticaj koji ima na multipliciranje (odnos tumor/životinja) neinvazivnog, invazivnog i ukupnog adenokarcinoma. Sa 40 % MTD uočeno je jako inhibitorno dejstvo na multipliciranje neinvazivnog i ukupnog adenokarcinoma ($p<0,05$), dok su sa 80 % MTD incidenca (% životinja sa tumorom) i multipliciranje invazivnog i ukupnog adenokarcinoma bili značajno umanjeni ($p<0,001$). Ros (Ross) i sar. su ispitivali da li askorbil-palmitat može biti zadržan u ćelijskoj membrani intaktnih eritrocita i da li ima protektivno dejstvo protiv oštećenja ćelija izazvanih peroksidacijom. Dokazano je da se ispitivani estar vezuje za spoljašnju površinu ćelijske membrane eritrocita pokazujući zaštitno delovanje protiv oksidacije α -tokoferola iz membrane i to putem dva potencijalna mehanizma: ili direktnom reakcijom sa egzogeno dodatim oksidansima ili recikliranjem α -tokoferola iz α -tokoferoksil-radikala u ćelijskoj membrani. Utvrđeno je da se askorbil-palmitat zadržava na spoljašnjoj površini humanih eritrocita gde štiti membrane od oksidativnog dejstva koje potiče van ćelije (194). U drugoj studiji je utvrđeno da se, kada se inkorporira u membranu eritrocita, L-askorbil-palmitat orijentiše tako da je askorbil-grupa locirana na spoljašnjoj površini, a da preko dela koji omogućava pristup hidrofobnoj unutrašnjosti membrana ima mogućnost recikliranja endogenog α -tokoferola tokom oksidativnog stresa (195). Takođe je ispitivano da li askorbil-palmitat ima protektivno dejstvo prema lipoproteinima velike gustine (high density lipoprotein – HDL) prilikom oksidacije izazvane hipohloritom, s obzirom na to da

se u slučaju oksidacije HDL-a gubi aktivnost kardio-protektivnog enzima – paraoksonaze-1 (PON1) (196). Ustanovljeno je da, iako je askorbil-palmitat znatno umanjio oštećenja i gubitak funkcije HDL-a pod dejstvom hipohlorita, to ipak nije dovelo do sprečavanja gubitka aktivnosti PON1, što ukazuje na mogućnost izrazite senzitivnosti enzima prema inaktivaciji u toku inflamacije.

Kada je određivana stabilnost askorbil-palmitata u rastvorima i emulzijama, utvrđeno je da se prevođenjem vitamina C u ester značajno smanjuje njegova sklonost ka hidrolizi, naročito u izrazito viskoelastičnim formulacijama (197). Međutim, magnezijum-askorbil-fosfat je pokazao veću stabilujuću moć, verovatno stabilizacijom endiolnog sistema zbog prisustva fosforne grupe u položaju 2 molekula vitamina C.

2.5. Prenos mase u enzimskim reaktorima

Bioreaktorski sistemi koji se koriste u procesima katalizovanim imobilisanim enzimima mogu pripadati bilo kojoj vrsti klasičnih bioreaktora – šaržni ili protočni reaktor sa mešanjem, reaktor sa pakovanim ili fluidizovanim slojem, membranski reaktor, “air-lift” reaktor (26). U svakom pojedinačnom slučaju se, u zavisnosti od svojstava biokatalizatora, reakcije, medijuma, zahtevane čistoće proizvoda, kapaciteta proizvodnje, finansija i drugo, sam izbor konfiguracije sistema i procesnih uslova mora pažljivo optimizovati, pri čemu se mora imati u vidu da se radi o višefaznim sistemima. Režim rada treba biti takav da se obezbede što manje difuzione limitacije (kinetički kontrolisani procesi), adekvatan prenos toplote i količine kretanja, u skladu sa zahtevima procesa, ali i stabilnost i aktivnost biokatalizatora. Na ovom mestu treba ponovo napomenuti prednosti imobilisanih enzima nad slobodnim, naročito u industrijskim uslovima: finansijska povoljnost usled višekratne upotrebe enzima i pojednostavljena separacija i prečišćavanje, mogućnost rada pri većim protocima i većoj brzini mešanja jer je enzim donekle zaštićen od smicajnih napona itd.

Da bi se bilo koji od navedenih tipova reaktora u potpunosti u određenim operativnim uslovima okarakterisao, potrebno je izvršiti analizu hidrodinamike, prenosa mase i prenosa toplote. U slučaju rada sa osetljivim biokatalizatorima (enzimima i ćelijama), naročito važan parametar je napon smicanja kome su čestice izložene. Optimalni procesni parametri treba da budu tako odabrani da čitav proces bude kinetički, a ne difuziono kontrolisan. Nekoliko teorija prenosa mase je od praktičnog značaja: teorija filma, teorija graničnog sloja, teorija penetracije. Model filma, kao jednostavan, ali prihvatljiv, uglavnom se upotrebljava za analizu fenomena prenosa mase (198). Osnovna njegova pretpostavka je da je ukupan otpor difuziji ekvivalentan otporu u uskom filmu tečnosti oko čestice, u kome je strujanje laminarno i u kome se čitav prenos mase odvija molekulskom difuzijom, a koncentracioni gradijent je gotovo linearan. Brzina molekulske difuzije zavisi direktno od debljine filma (koju nije moguće eksperimentalno meriti), difuzivnosti supstrata u reakcionom medijumu, kao i protoka reakcione smeše (brzina doticanja supstrata do enzima i brzina odvođenja proizvoda nazad u medijum).

Koeficijent prenosa mase (k) definiše se preko fluksa (J_s) i razlike u koncentraciji supstrata u reakcionoj smeši u masi tečne faze (C_r) i na granici faza (C_g) kao pogonske sile na sledeći način:

$$J_s = k(C_r - C_g)$$

Teorija filma fluks definiše kao:

$$J_s = \frac{D}{\delta} (C_r - C_g)$$

pri čemu je D koeficijent difuzije supstrata, a δ debljina hidrodinamičkog sloja. Iz prethodne dve jednačine sledi da je koeficijent prenosa mase direktno proporcionalan koeficijentu difuzije i obrnuto srazmeran debljini graničnog sloja:

$$k = \frac{D}{\delta}$$

U novije vreme se intenzivno radi na sistematskom i teorijskom izučavanju i razumevanju ovih fenomena, ali su i dalje u upotrebi uglavnom empirijske korelacije koje su proizvod analiza pojedinačnih slučajeva. U ovim empirijskim korelacijama figurišu bezdimenzioni parametri (Re , Sc , Sh). Rejnoldsov (Reynolds) broj (Re) predstavlja odnos inercijalnih i viskoznih sila u fluidu, i njime se definiše režim strujanja, Šmitov (Schmidt) broj (Sc) je odnos kinematske viskoznosti i difuzivnosti, a Šervudov (Sherwood) broj (Sh) predstavlja odnos konvektivnog i difuzivnog prenosa mase. Empirijskim formulama je, na odgovarajuće načine, u zavisnosti od režima strujanja i samog sistema (oblika i veličine čestica, poroznosti, načina pakovanja čestica i drugo), izražen Šervudov bezdimenzioni kriterijum kao funkcija Re i Sc . Na taj način se određuje i koeficijent prenosa mase, koji i definitivno karakteriše jedan sistem sa aspekta efikasnosti prenosa mase.

Da bi se bioreaktorski sistemi sa imobilisanim enzimima opisali u smislu efekta difuzionih limitacija na proces, definišu se dodatni bezdimenzioni kriterijumi. Za sisteme sa enzimima imobilisanim na neporozne nosače karakterističan je Damklerov (Damköhler) kriterijum (Da) koji predstavlja relativni odnos brzine reakcije (V_m' - maksimalna brzina reakcije po jedinici mase biokatalizatora) i brzine kojom se odigrava prenos mase:

$$Da = \frac{V_m'}{kCr}$$

Ukoliko je $Da \ll 1$ može se smatrati da se proces spoljašnjeg prenosa mase odigrava znatno brže od same reakcije i da je proces kinetički kontrolisan, dok je u suprotnom ($Da \gg 1$) brzina reakcije veća od brzine kojom se odigrava prenos mase, pa je proces difuziono kontrolisan. U slučaju kada se ova dva procesa odigravaju približno istim brzinama, $Da \approx 1$. Kada je biokatalizator imobilisan na porozne nosače, mora se uzeti u obzir i prenos mase u porama nosača koji se odvija na način drugačiji od onog na površini čestice (199). Umesto difuzivnosti, u proračunu se koristi efektivna difuzivnost (De_f) koja u obzir uzima i poroznost čestica koja predstavlja odnos zapremine pora i ukupne zapremine

čestice (ε_p) i tortuoznost (eng. tortuosity) odnosno uvijenost unutrašnjih pora (T) čestica na koje je enzim imobilisan koja predstavlja odnos realnog puta koji molekul pređe između dve tačke i najkraće razdaljine između te dve tačke:

$$Def = D \frac{\varepsilon_p}{T}$$

Tada se definiše nova bezdimenziona veličina – Tielov modul (observable Thiele modulus) ili Vajsov (Weisz) modul (Φ) čija vrednost treba da bude manja ili jednaka 0,3 da bi se smatralo da difuzione limitacije nemaju uticaj na odigravanje reakcije (200). Pored toga, mora da bude zadovoljen i uslov da je brzina kojom se reakcija odigrava u sistemu približno jednaka brzini kojom se ona odvija u sistemu bez otpora prenosu mase (sa slobodnim enzimom). Ukoliko se ove dve vrednosti značajno razlikuju, a Φ je veći ili jednak 3, smatra se da je otpor prenosu mase u sistemu značajan u da je čitav proces difuziono kontrolisan.

U daljem tekstu biće ukratko opisani osnovni tipovi enzimskih reaktora koji su korišćeni u okviru ove doktorske disertacije – šaržni bioreaktor sa mešanjem i bioreaktor sa fluidizovanim slojem.

2.5.1. Šaržni bioreaktor sa mešanjem

Šaržni bioreaktori sa mešanjem su najstariji tip bioreaktora razvijen i upotrebljen u biotehnologiji, kako u industriji, tako i na laboratorijskom nivou (201). Raznovrsnost ovog tipa bioreaktora je velika (različiti oblici reaktora i tipovi mešanja – mešalicom, barbotiranjem gasa, cirkulacijom tečnosti i dr.). U laboratorijskoj praksi, najčešća je primena orbitalnog ili linearnog mešanja na tresilicama sa termostatom. Za mešanje se koriste različiti tipovi mešalica, i u ovom slučaju je bitna karakteristika gotovo idealno mešanje. Ipak, brzina fluida je najveća u okolini mešalice a tu su i smicajni naponi najveći, a najmanja uz zidove reaktora gde su naponi smicanja najmanji.

Najvažniji parametar za projektovanje procesa u bioreaktoru sa mešanjem je broj obrtaja mešalice pri kome se uz minimalni utrošak energije ostvaruje mešanje kojim čestice sa imobilisanim biokatalizatorom ostaju suspendovane u toku reakcije. Ovu kritičnu brzinu rotacije diktiraju prečnik lopatica mešalice i osobine reakcionog medijuma. Dva su bezdimenziona parametra značajna za osnovno definisanje jednog šaržnog bioreaktora (201):

Faktor snage

$$Np = \frac{P}{n^3 d^5 \rho}$$

Rejnoldsov broj

$$Re = \frac{nd^2}{\nu}$$

P -snaga, n -brzina rotacije, d -prečnik mešalice, ρ -gustina, ν -kinematska viskoznost.

Pri turbulentnom režimu strujanja N_p ima konstantnu vrednost i ne zavisi od Rejnoldsovog broja. Potrebna snaga mešanja će zavistiti od režima strujanja fluida (Re) i tipa mešalice. Turbulentan režim strujanja fluida je uslov za dobru izmešanost u bioreaktoru što je preduslov za efikasan prenos mase između faza. Ovaj tip reaktora se uglavnom može aproksimirati idealnim šaržnim reaktorom. Nasuprot kontinualnim sistemima, vreme zadržavanja enzima i supstrata su u ovom slučaju jednaki. Za razliku od laboratorijskog nivoa, pri većim razmerama procesa hidrodinamika sistema se usložnjava, pa se pri “scale up-u” moraju definisati i dodatni parametri.

Za konkretan slučaj odigravanja procesa u sudu (erlenmajeru ili balonu) sa orbitalnim mešanjem, definiše se modifikovani faktor snage (Ne') (202, 203):

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0,6} + 1,5Re^{-0,2}$$

iz koga se dalje dobija vrednost potrebne snage mešanja (P):

$$P = Ne' \rho n^3 d^4 V_{sm}^{1/3}$$

pri čemu je d u ovom slučaju maksimalni unutrašnji prečnik mešanja.

Da bi prethodne jednačine mogle biti primenjene, moraju biti zadovoljeni takozvani “in phase” uslovi rada u kojima je većina tečnosti u fazi sa mešanjem, dok u suprotnom, kada su ostvareni “out of phase” uslovi veliki deo tečnosti ostaje na dnu suda i gotovo je nepokretan. Ovakav režim, kojim su definisani pogodni operativni uslovi rada, ostvaren je ukoliko je zadovoljen sledeći uslov:

$$Fr_a = \frac{(2\pi n)^2 d_0}{2g} > 0,4$$

$$Ph = \frac{d}{d_0} (1 + 3 \log Re_f) > 1,26$$

$$Re_f = \frac{\pi}{2} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2$$

U prethodnim jednačinama figurišu sledeći parametri: Fr_a – aksijalni Frodov broj, Ph – fazni broj i Re_f – Rejnoldsov broj za film tečnosti.

2.5.2. Protočni bioreaktor sa fluidizovanim slojem

Bioreaktori sa fluidizovanim slojem predstavljaju kolonu u kojoj su čestice imobilisanog enzima u fluidizovanom stanju koje se ostvaruje pri određenom protoku tečne faze u smeru vertikalno na gore. Na neki način, ovi reaktori obezbeđuju uslove rada u kojima se neki problemi vezani za reaktore sa pakovanim slojem uspešno prevazilaze. Osnovne prednosti bioreaktora sa fluidizovanim slojem, u odnosu na bioreaktore sa pakovanim slojem, jesu bolji prenos mase i toplote uz uniformniju raspodelu protoka fluida i odsustvo koncentracionog gradijenta duž kolone, manji pad pritiska, manja koalescencija (kod kapljica emulzija), izostatak kanalisanja itd. Problem kod ovih reaktora je što uslovi rada zahtevaju nosače i način vezivanja enzima koji će izdržati trenje, sudare i veće smicajne napone pri fluidizaciji. Različite varijante ovih bioreaktora podrazumevaju uduvavanje gasa, strujanje supstrata na dole (kod lakših čestica), diskontinualno dodavanje supstrata (fluidizacija gasom) ili samo kolone atipičnih oblika. Uglavnom se radi o dvofaznim sistemima, sastavljenim iz tečnog supstrata i čvrstih čestica imobilisanog biokatalizatora, ili trofaznim sistemima, gde se gas javlja kao proizvod reakcije, drugi supstrat ili fluid za intenziviranje mešanja. U oba slučaja je, kao i kod kolona sa pakovanim slojem, najbitniji procesni parametar protok tečne (ili gasne) faze (204).

Stanje fluidizacije podrazumeva da se čitav sloj nalazi u lebdenju, zahvaljujući energiji koju fluid saopštava česticama. Uslov lebdenja je ravnoteža svih sila koje deluju na čestice, pa se dobija:

$$-\frac{\Delta p}{h} = (\rho_c - \rho)(1 - \varepsilon)g$$

iz čega je jasno da je gradijent pritiska u sloju direktno proporcionalan koncentraciji čestica u sloju. U prethodnoj jednačini je Δp – gradijent pritiska, h – visina fluidizovanog sloja, ρ_c – gustina čestica, ρ – gustina fluida, ε – poroznost sloja i g – gravitaciono ubrzanje.

Tabela 2.4. Korelacije za izračunavanje Šervudovog broja u reaktorima sa fluidizovanim slojem.

Korelacije za izračunavanje Šervudovog broja	Opsezi važenja korelacija	Ref.
$Sh = 3,8155Re''^{0,2667} Sc^{1/3}$ za $Re'' < 20$ $Sh = 1,6218Re''^{0,5553} Sc^{1/3}$ za $Re'' > 20$	$Re'' = Re, \check{c}(1 - \varepsilon)$; $0,01 < Re'' < 12000$ $572 < Sc < 70000$; $0,268 < \varepsilon < 0,9653$	(205)
$Sh = 0,253Re, \check{c}^{0,004} Ga^{0,319} Mv^{0,299} Sc^{0,4}$	$Mv = (\rho_c - \rho)\rho; Ga = gd_c^3 \rho^2 / \mu^2$ $1,6 < Re, \check{c} < 1320$; $0,27 < Mv < 114$ $2470 < Ga < 442106$; $305 < Sc < 1595$	(206)
$Sh = 0,261Re, \check{c}^{0,03} Ga^{0,324} Sc^{1/3}$	$15 < Re, \check{c} < 400$; $1361 < Sc < 1932$	(207)

Pri formiranju fluidizovanog sloja, nakon dostizanja brzine minimalne fluidizacije, pri daljem povećanju brzine fluida dolazi do ekspanzije sloja, sve do postizanja određene brzine – brzine odnošenja pri kojoj čestice počinju da bivaju odnošene fluidom.

Za praćenje hidrodinamike u bioreaktorima sa fluidizovanim slojem koriste se brojne empirijske korelacije koje omogućavaju da se odredi koeficijent prenosa mase u različitim sistemima i pri različitim režimima rada. Neke od njih predstavljene su u tabeli 2.4. U ovim sistemima se uglavnom primenjuju čestice malih dimenzija (20-40 μm) kako bi katalitička površina bila što veća. Ovo je naročito značajno za neporozne čestice, ali je u ovom slučaju značajno da čestice imaju dovoljno veliku gustinu da ne bi došlo do njihovog odnošenja. Sa druge strane, čestice većih dimenzija moraju imati nešto manju gustinu. Značajan parametar je uniformnost veličine čestica jer će ukoliko su čestice neujednačenih dimenzija doći do formiranja neuniformnog gradijenta koncentracije duž reaktora. Velike brzine proticanja fluida treba izbegavati jer mogu dovesti do spiranja enzima sa nosača kao i njegove inaktivacije pod dejstvom tangencijalnih napona. Iako se u bioreaktorima sa fluidizovanim slojem usled uniformnog mešanja supstrata dobija proizvod uniformnih osobina, nepouzdana uvećanje razmera procesa je njihov glavni nedostatak na putu ka komercijalizaciji postupaka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Kao acil-akceptor u reakcijama sinteze estara korišćena je L-askorbinska kiselina (99,7 %) proizvođača Zorka, Šabac, Srbija.

Kao kiselinski supstrati upotrebljavane su sledeće hemikalije:

- oleinska kiselina (Ph Eur, NF čistoće), Appli Chem, Darmštat, Nemačka
- sirćetna kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- kapronska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- kaprinska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- miristinjska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- stearinska kiselina (98 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- linolna kiselina (60 %), Acros Organics, Nju Džersi, SAD
- suncokretovo ulje, Vital, Vrbaš, Srbija
- laneno ulje, Sucokret d.o.o., Hajdukovo, Srbija
- kokosovo ulje, Filipini (Beyond, Niš, Srbija)
- svinjska mast, Smederevo

Kao rastvarači u kojima se odigravala reakcija korišćeni su:

- aceton (99,5 %), Zorka Pharma, Šabac, Srbija
- *t*-butanol (99 %), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- acetonitril (p.a), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *n*-heksan (95-98,5 %), Carlo Erba Reagents, Milano, Italija
- izooktan (99,5 %), Centrohem, Stara Pazova, Srbija

Pri određivanju sadržaja vode upotrebljeni su Hydranal[®]-rastvarač i Hydranal[®]-titrant proizvođača Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka

Za HPLC analize su primenjivana sledeća jedinjenja:

- metanol (HPLC), JT Baker, SAD
- acetonitril (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- izopropanol (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- fosforna kiselina (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD

- mravlja kiselina (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- natrijumova so 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonat, (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- deuterisani hloroform, (HPLC), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- metil-estri kaprilne, kaprinske, laurinske, miristinske, palmitinske, stearinske, oleinske i linolne kiseline (99 %), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD

Kao adsorbens su upotrebljavana molekulska sita čija je veličina pora 0,4 nm, proizvođača Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćen je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka).

Kao biokatalizatori su primenjivani sledeći enzimski preparati:

- Lipaza tipa B iz *C. antarctica* produkovana od strane genetski modifikovane plesni *A. niger*, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- Novozym[®] 435, Novozymes, Bagsvard, Danska
- Lipaza iz *R. miebei* imobilisana na Immobead 150, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- Lipaza iz *T. lanuginosus* imobilisana na Immobead 150, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- Lipaza iz *C. rugosa*, liofolizovana, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka

Kao nosači za imobilizaciju lipaze korišćeni su:

- Purolite[®] MN102, Bala Sinvid, SAD
- Purolite[®] A109, Bala Sinvid, SAD
- Eupergit[®] C250L, Röhm GmbH & Co., Darmštat, Nemačka
- Eudragit[®] S-100, Evonik, Darmštat, Nemačka
- Aerosil[®] 380, Evonik Industries, Esen, Nemačka

Ostale hemikalije i uređaji koji su korišćeni u toku eksperimentalnog rada su:

- Triton[®] X-100, Acros Organics, Nju Džersi, SAD
- *p*-nitrofenil-butirat (98 %), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- dioksan (≥99 %), Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD
- albumin iz goveđeg seruma, Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD

- askorbil palmitat ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Štajnhajm, Nemačka
- anhidrovani natrijum-dihidrogenfosfat i dinatrijum-hidrogenfosfat, Centrohem, Stara Pazova, Srbija
- N-fenilaminopropiltrimetoksisilan (PAPMS), ABCR GmbH & CO, Karlsruhe, Nemačka
- 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS), Fluka analytical, SAD
- hlortriazin (cijanurilhlorid), Fluka analytical, SAD
- kalijum hidroksid, p.a., Centrohem, Stara Pazova, Srbija
- natrijum-sulfat, p.a., Centrohem, Stara Pazova, Srbija
- hlороform, p.a., Centrohem, Stara Pazova, Srbija
- analitička vaga, Mettler AJ100, Mettler Toledo, Švajcarska
- centrifuga, MiniSpin eppendorf, Eppendorf, SAD
- magnetna mešalica, IKA, SAD
- roler mikser, Stuart, Pariz, Francuska
- UV-spektrofotometar, Ultrospec™ 3300 pro, Biochrom Ltd., Frajburg, Nemačka
- termostat sa orbitalnim mešanjem, IKA KS 4000i Control, Štaufen, Nemačka
- vakuum sušnica, Binder Inc., Njujork, SAD
- vakuum uparivač, Rotavapor® R-210, BÜCHI Labortechnik AG, Flavil, Švajcarska
- peristaltička pumpa, PLP 33, behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Nemačka

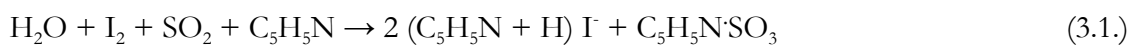
3.2. Metode

3.2.1. Enzimaska sinteza estara u šaržnom sistemu

Reakcije sinteze estara izvođene su u šlifovanim erlenmajerima zapremine 100 mL. Reakciona smeša se sastojala iz različitih količina vitamina C, karboksilne kiseline (sirćetne, kapronske, kaprinske, miristinske, stearinske, oleinske ili linolne) ili ulja/masti, rastvarača, vode, molekulskih sita i enzima (količine definisane za svaki eksperiment pojedinačno) tako da je njena ukupna zapremina iznosila 10 ili 5 mL. Prvo su supstrati i adsorbens i voda (ukoliko su dodavani) odmeravani u sud, zatim je smeša dopunjavana rastvaračem do određene zapremine, da bi nakon polučasovnog termostatiranja na temperaturi izvođenja reakcije bio dodavan enzim, čime je proces esterifikacije iniciran. Nakon toga uzorci su termostatirani na orbitalnoj mešalici pri 200-250 min⁻¹ u toku definisanog vremenskog perioda, dok je uzorkovanje 50-100 µL smeše vršeno u određenim vremenskim trenucima. Kvantitativna analiza uzoraka vršena je primenom reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi (RP-HPLC). Kontrolni uzorci (bez enzima) pripremani su na isti način i izlagani istoj temperaturi i u njima nije detektovan proizvod.

3.2.2. Određivanje sadržaja vode u reakcionoj smeši metodom po Karlu i Fišeru

Sadržaj vode u reakcionim smešama određen je prema Karl-Fišer (Karl-Fisher) metodi na način opisan u literaturi (16). Sam princip određivanja zasniva se na kvantitativnoj reakciji između joda i sumpor-dioksida u prisustvu nižih alkohola (uglavnom metanola) i organskih baza tipa piridina prema jednačini (3.1. i 3.2.):



Merenje je vršeno korišćenjem automatizovane aparature za održavanje sadržaja vode po Karlu i Fišeru (Mettler Toledo, SAD) korišćenjem Hydranal[®] rastvarača za rastvaranje uzorka i Hydranal[®] titranta za titraciju. Aparatura se sastojala iz automatske birete, suda za titraciju, mešalice i opreme za potenciometrijsku titraciju. Primenjen je volumetrijski postupak određivanja koji podrazumeva da se jod rastvori u rastvoru za titrisanje uzorka u kome se određuje sadržaj vode, pri čemu se koncentracija vode određuje na osnovu

količine joda utrošenog u reakciji sa vodom iz uzorka. Aparatura je bila zaštićena kalcijum-hloridom od vlage iz vazduha.

3.2.3. Kinetička studija

Kinetičke studije izvođene su u skladu sa eksperimentalnim planom koji se sastojao iz 64 tačke (matrica 8×8) koje predstavljaju sve moguće kombinacije koncentracija dva supstrata: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1 M. Početne brzine su određivane kao nagib tangente na reakcionu krivu u početnim fazama reakcije na osnovu prosečne vrednosti dva nezavisno izvedena eksperimenta pod istim reakcionim uslovima. Linearni deo racione krive koji je uziman u obzir obično se sastojao iz 4-6 eksperimentalnih tačaka (nakon 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 h) uz zadovoljavanje uslova da je koeficijent linearnosti veći od 0,95.

3.2.4. Kvantitativne analize uzoraka

Za kvantitativnu analizu uzoraka korišćena su dva sistema: Akta Purifier HPLC sistem (Amersham Pharmacia Biotech, Piskatavej, SAD) sa reverzno-faznom kolonom Waters Spherisorb ODS 2-C18 250 mm × 4,6 mm, 5 µm (Waters, Milford, SAD) i Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Voltam, SAD) HPLC sistem sa reverzno faznom kolonom Hypersil gold C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm istog proizvođača. Injekcione zapremine uzoraka razblaženih 10-50 puta bile su između 5 i 15 µL. Kada su kao donori acil-ostatka korišćene kiseline, primenjena je izokratska elucija sa protokom 0,5-1 mL min⁻¹ i eluent se sastojao iz metanola i vode sa 0,1 %(v/v) fosforne kiseline. Za određivanje askorbil-acetata i -kapronata mobilna faza je bila 70 % MeOH, za -kaprinat i -miristat 90 % MeOH i 100 % MeOH za -stearat i -oleat. U slučaju kada su acil-donori bili trigliceridi dobijana je smeša proizvoda, a uzorak je bio hidrofobnije prirode, pa je primenjena metoda razdvajanja sa gradijentom koji je obezbedio dovoljno dobro razdvajanje proizvoda, kao i ispiranje neproreagovalih mono-, di- i triglicerida sa kolone. Elucija je vršena sa dve mobilne faze (A: MeOH:H₂O:HCOOH = 95:5:0,1 % i B: 100 % izopropanol (IP)) i to na sledeći način: 0-5 min izokratski 100 % A, 5-10 min gradijent od 100 % A do 100 % B, 10-15 min izokratski 100 % B, 15-15,1 gradijent od 100 % B do 100 % A, 15,1-25 min izokratski 100 % A. Protok eluenta je sve vreme bio 1 mL min⁻¹, a kolona je bila termostatirana na 40 °C. Detekcija proizvoda vršena je UV detektorom na 235 nm.

3.2.5. Prečišćavanje proizvoda

Reakciona smeša je filtrirana pod vakuumom na Bihnerovom levku, uparena pod sniženim pritiskom i razblažena tako da krajnje razblaženje u odnosu na početnu racionu smešu bude deset puta. Razblaženi uzorci nanošeni su na HPLC sistem opremljen frakcionim kolektorom. Korišćena je semi-preparativna reverzno-fazna Hypersil Gold ODS kolona (250 mm × 10 mm, 5 µm) proizvođača Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD prekondicionirana mobilnom fazom. Sastav mobilne faze bio je 70-95 %, acetonitril u vodi sa 0,1 % mravlje kiseline, u zavisnosti od askorбил-estra, a njen protok j iznosio 6 mL min⁻¹. Injekciona zapremina je iznosila 1 mL, a prikupljane su frakcije čistog proizvoda od po 0,5 mL čija je čistoća nakon toga ponovo testirana na anličkoj koloni i koje su na kraju uparavane do konstantne mase. Detekcija je vršena na talasnoj dužini od 235 nm.

3.2.6. Spektralne analize

NMR spektri su dobijeni korišćenjem Varian Gemini 200 (¹H NMR na 200 MHz, ¹³C NMR na 50 MHz) uređaja (Varian Medical Systems, Palo Alto, SAD). Hemijska pomeranja izražena su u ppm (δ, parts per million) korišćenjem natrijumove soli 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonata kao internog standarda.

3.2.7. Određivanje operativne stabilnosti biokatalizatora

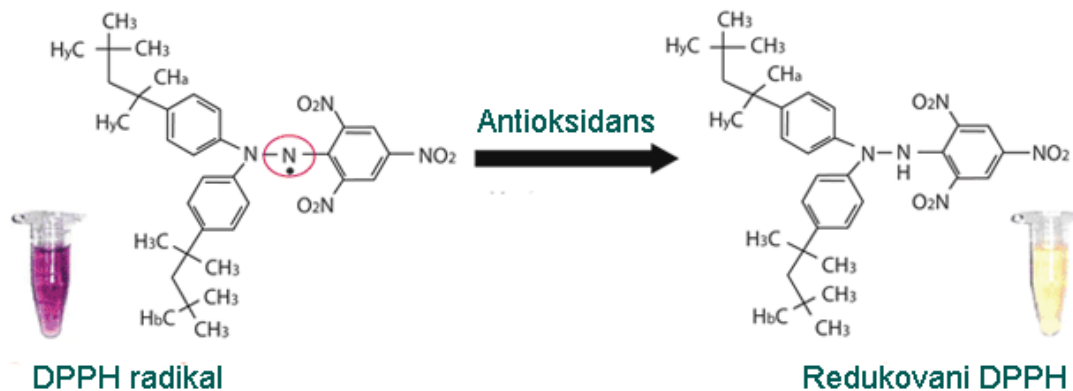
Eksperimenti su izvođeni pod definisanim reakcionim uslovima u toku određenog vremenskog perioda nakon čega je uzimano po 50 µL uzorka za kvantitativnu analizu, dok je enzim odvajan od ostatka reakcione smeše vakuum-filtracijom. Imobilisana lipaza je nakon toga ispirana tri puta sa po 20 mL acetona, sušena oko 3 h na 37 °C i čuvana na 4 °C do sledeće upotrebe, nakon čega je korišćena u narednom reakcionom ciklusu. Rezultati su izražavani kao relativna aktivnost biokatalizatora zadržana u odnosu na prvi reakcioni ciklus.

Kada je primenjivan postupak reaktivacije imobilisanog enzima, on je nakon završenog ispitivanja operativne stabilnosti tretiran u toku 30 min pri 100 obrtaja u minutu na 25 °C u prisustvu 10 mL 0,05 M natrijum-fosfatnog pufera.

3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti L-askorбил-estara

Antioksidativno desjstvo sintetisanih estara, komercijalnog askorбил-palmitata i vitamina C određivano je primenom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metode (slika 3.1.). Sama

metoda bazirana je na sposobnosti testiranih jedinjenja da redukuju stabilni DPPH radikal prihvatanjem jednog elektrona.



Slika 3.1. DPPH metoda (208).

Reakciona smeša se sastojala iz 200 μL uzorka koncentracije 0-5 mg mL^{-1} , 200 μL rastvora DPPH u metanolu koncentracije 0,15 mM i 600 μL čistog metanola. Kontrolni uzorci bili su sastavljeni iz 800 μL metanola i 200 μL rastvora DPPH. Smeše su vorteksirane 2 minuta i ostavljane da stoje 30 min u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbance su nakon toga merene spektrofotometrijski na 517 nm a kapacitet za vezivanje slobodnih radikala izračunavan je u procentima na sledeći način:

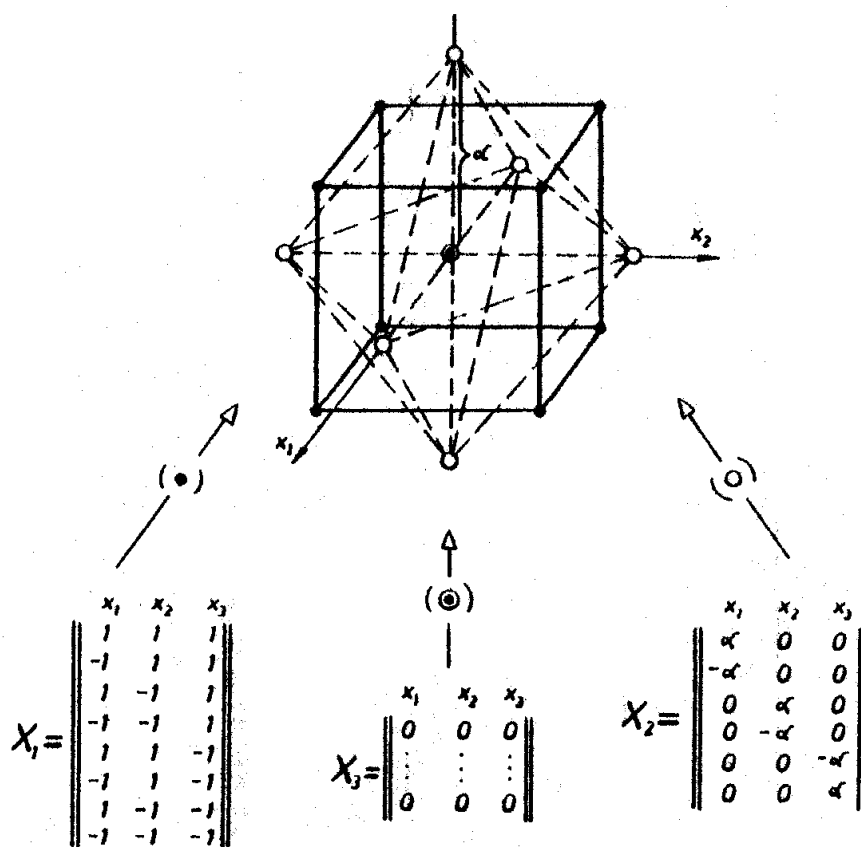
$$\text{Kapacitet vezivanja (\%)} = \frac{A_k - A_u}{A_k} 100\%$$

pri čemu je A_k apsorbance kontrolnog uzorka dok je A_u apsorbance ispitivanog uzorka. Krajnji rezultat iskazivan je kao IC_{50} (half minimal inhibitory concentration) vrednost koja predstavlja koncentraciju antioksidansa potrebnu da se početna koncentracija DPPH radikala smanji za 50 %.

3.2.9. Centralni kompozitni rotabilni plan i metoda odzivnih površina

Za ispitivanje uticaja i optimizaciju reakcionih faktora upotrebljeno je statističko planiranje eksperimenata, a za analiziranje rezultata metoda odzivnih površina. Uticaj pet eksperimentalnih faktora (koncentracije vode dodate u reakcionu smešu (x_1), temperature (x_2), koncentracije lipaze (x_3), molskog odnosa supstrata (x_4) i početne koncentracije askorbinske kiseline (x_5)) ispitivan je pomoću centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana (CCRD) na pet nivoa vrednosti ispitivanih faktora. Rotabilni planovi su veoma česti u eksperimentalnom istraživanju, modelovanju i adaptivnom

upravljanju višefaktornim procesima. Osnovna karakteristika ovih planova je da je disperzija modela dobijenog pomoću ovog plana konstantna u svim tačkama hipersfere radijusa $\sqrt{\sum x_i^2}$ i da samim tim ne zavisi od pravca u višefaktornom eksperimentalnom prostoru, već samo od radijusa faktornog prostora. To znači da sve tačke koje su jednako udaljene od centralne tačke eksperimentalnog plana imaju istu količinu informacija koje sadrži model dobijen na osnovu ovog plana (16). Formiranje ortogonalnih planova je ilustrovano na slici 3.2. na primeru formiranja trofaktornih planova.



Slika 3.2. Centralni kompozitni rotatabilni eksperimentalni plan u trofaktornom prostoru (16).

Primenjeni plan se sastojao od 32 eksperimentalne tačke (16 faktorijalnih, 10 aksijalnih i 6 centralnih), a ispitivani faktori su varirani u sledećim opsezima: početna koncentracija vode (0,018-0,218 %(v/v)), temperatura (40-60 °C), početna koncentracija enzima (0,2-1 %(w/v)), početni molarni odnos acil-akceptora i kiseline (1:3-1:15) i koncentracija askorbinske kiseline (0,02-0,22 M) (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Eksperimentalni plan sa stvarnim i kodiranim vrednostima parametara.

Eksp.	Početna koncentracija vode (%(v/v))	Temperatura (°C)	Koncentracija enzima (%(w/v))	Molski odnos supstrata	Koncentracija vitamina C (M)
1	0,168(1)	55(1)	0,8(1)	1:12(1)	0,17(1)
2	0,168(1)	55(1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,07(-1)
3	0,168(1)	55(1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,07(-1)
4	0,168(1)	55(1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,17(1)
5	0,168(1)	45(-1)	0,8(1)	1:12(1)	0,07(-1)
6	0,168(1)	45(-1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,17(1)
7	0,168(1)	45(-1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,17(1)
8	0,168(1)	45(-1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,07(-1)
9	0,068(-1)	55(1)	0,8(1)	1:12(1)	0,07(-1)
10	0,068(-1)	55(1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,17(1)
11	0,068(-1)	55(1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,17(1)
12	0,068(-1)	55(1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,07(-1)
13	0,068(-1)	45(-1)	0,8(1)	1:12(1)	0,17(1)
14	0,068(-1)	45(-1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,07(-1)
15	0,068(-1)	45(-1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,07(-1)
16	0,068(-1)	45(-1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,17(1)
17	0,218(2)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
18	0,018(-2)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
19	0,118(0)	60(2)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
20	0,118(0)	40(-2)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
21	0,118(0)	50(0)	1(2)	1:9(0)	0,12(0)
22	0,118(0)	50(0)	0,2(-2)	1:9(0)	0,12(0)
23	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:15(2)	0,12(0)
24	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:3(-2)	0,12(0)
25	0,188(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,22(2)
26	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,02(-2)
27*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
28*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
29*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
30*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
31*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)
32*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)

* - centralna tačka.

Dobijeni rezultati su modelovani polinomom drugog reda koji uključuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora:

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^5 \beta_{ki} X_i + \sum_{i=1}^5 \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^5 \beta_{kij} X_i X_j$$

gde je Y odzivna veličina, β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} i β_{kij} koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijenti regresije, X_i i X_j nezavisne varijable, a k broj pojedinačnih faktora. Adekvatnost modela je testirana disperzionom analizom modela. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička signifikantnost su određeni metodom najmanjih kvadrata korišćenjem programa Matlab 7.0 (Mathworks Inc., Natick, SAD). Samo signifikantni članovi ($p \leq 0,05$)

su uključeni u finalni, redukovani model, za šta je korišćen Studentov *t*-test. Adekvatnost regresionog modela, tj. adekvatnost matematičkog ispitivanja datog objekta ispitivanja (predstavljenog skupom eksperimentalnih rezultata), sastoji se u upoređivanju disperzije eksperimentalnih rezultata u odnosu na krivu regresije, i disperzije eksperimentalnih rezultata u tačkama eksperimentalnog plana i vršena je primenom Fišerovog testa.

3.2.10. Imobilizacija lipaze na Purolite® MN102

Smeša u kojoj je izvođena imobilizacija sastojala se iz 20 mg nosača i različitih količina lipaze, a dopunjavana je određenim puferom do zapremine od 350 μ L. Korišćeni su natrijum-fosfatni puferi različitih molariteta (50 mM, 0,2 M, 0,5 M i 1 M) i pH vrednosti (5, 6, 7 i 8), a imobilizacija je izvođena na 25 °C uz orbitalno mešanje. Nakon određenih perioda vremena imobilisani enzim je odvajan od supernatanta, ispiran tri puta sa po 1 mL pufera u kome je vršena imobilizacija i sušen do konstantne mase na 37 °C pre upotrebe. Desorpcija je vršena 5 % rastvorom Triton®-a X-100 u toku jednog sata na 25 °C.

3.2.11. Imobilizacija lipaze na Purolite® A109

Priprema i modifikacija nosača, kao i imobilizacija CAL B izvođena je prema proceduri prethodno ustanovljenoj na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju i opisanoj u literaturi (25). Purolite® A109 je pre upotrebe kvašen prema proceduri koju je opisao Hernandez sa sar. uz neznatne modifikacije (209). Jedan gram nosača je suspendovan u 10 mL acetonitrila i smeštan u ultrazvučno kupatilo na 1 h, nakon čega je dodavano 10 mL vode i tretman ultrazvukom je nastavljan još 1 h. Nakon toga je nosač odvajan na Bihnerovom levku, resuspendovan u još 10 mL vode i inkubiran u ultrazvučnom kupatilu još 1 h. Na kraju je nosač izdvajan iz suspenzije, ispiran tri puta sa po 10 mL vode i čuvan na 4 °C do upotrebe. Modifikacija nosača je vršena u toku 40 minuta na 52 °C sa 14,2 % (v/v) epihlorhidrina u 1 M NaOH. Zatim je CAL B imobilisana dodavanjem 20 mg nosača i 50 μ L lipaze u 300 μ L 1 M fosfatnog pufera pH 7, u toku 24 h na 25 °C uz orbitalno mešanje. Nakon toga je imobilisani enzim filtriran pod vakuumom, ispiran tri puta sa po 1 mL pufera i sušen pod vakuumom pre upotrebe.

3.2.12. Imobilizacija lipaze na Eupergit® C250L

Imobilizacija je izvođena sa 50 mg nosača i različitim količinama lipaze u zapremini od 1 mL koja je podešavana dodavanjem 1 M natrijum-fosfatnog pufera pH=7. Proces je vođen

na 25 °C u toku 20 h na orbitalnoj mešalici. Separacija, ispiranje i sušenje imobilisane lipaze vršeni su na način opisan u poglavlju 3.2.11.

3.2.13. Imobilizacija lipaze na Eudragit® S-100

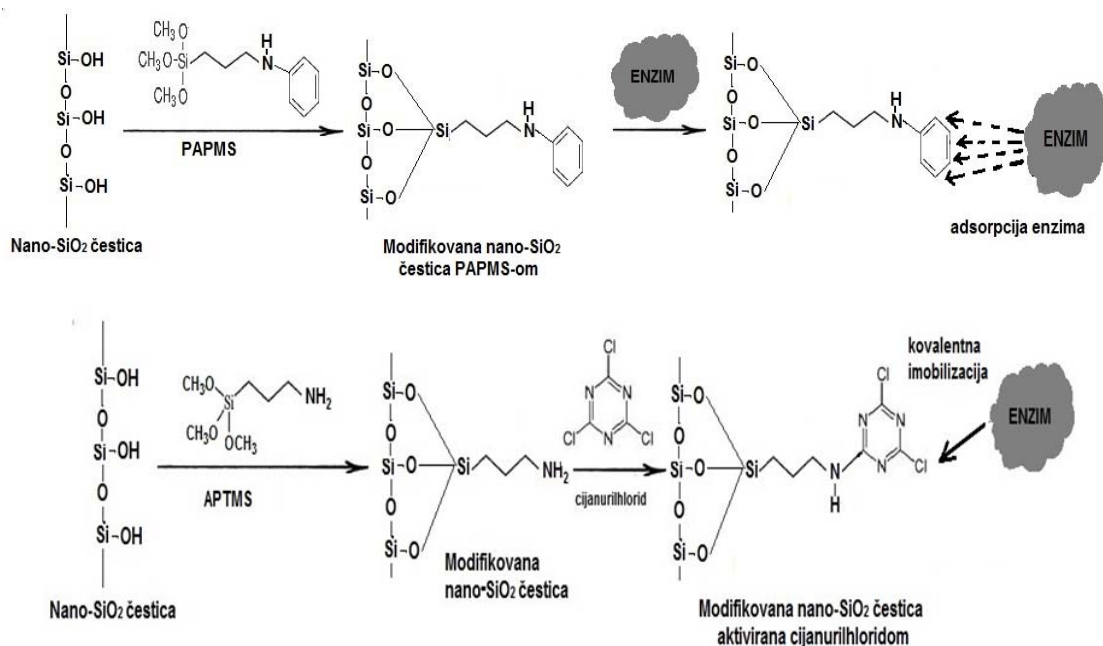
Pre imobilizacije CAL B, Eudragit® S-100 je rastvaran na sledeći način: 1,25 g praškastog nosača mešano je sa 22,5 mL vode nakon čega je pažljivim dodavanjem 3 M NaOH pH podešavan na 11 pri čemu polimer postaje rastvoren u potpunosti. Zatim je postepeno dodavana 3 M HCl do postizanja pH 7, a pripremljeni rastvor polimera je dopunjavan destilovanom vodom do 25 mL i čuvan na 4 °C do upotrebe. Imobilizacija CAL B na Eudragit® S-100 vršena je mešanjem određenih količina rastvora polimera i lipaze do ukupne zapremine od 0,5 mL tako da je koncentracija proteina varirana u opsegu 17,5-500 mg g⁻¹ nosača i inkubiranjem na sobnoj temperaturi uz orbitalno mešanje u toku jednog sata. Nakon toga je imobilisani enzim prevođen u suspenziju dodavanjem 0,1 M sirćetne kiseline do postizanja pH 4,5 i stajanjem na sobnoj temperaturi u toku 20 min. Zatim je imobilisani enzim izdvajan iz suspenzije dvadesetominutnim centrifugiranjem na 12000 obrtaja u minutu. Kada je imobilisani enzim ispiran vodom da bi slabo vezani molekuli lipaze bili uklonjeni sa nosača, ponavljan je postupak: dodavano je 0,5 mL vode, zatim je imobilizat taložen rastvorom sirćetne kiseline, nakon čega je odvajanje centrifugiranjem i dalje analiziran. Ispiranje 1 % Triton®-om X-100 radi desorpcije lipaze koja je sa nosačem uspostavila hidrofobne interakcije je vršeno na identičan način.

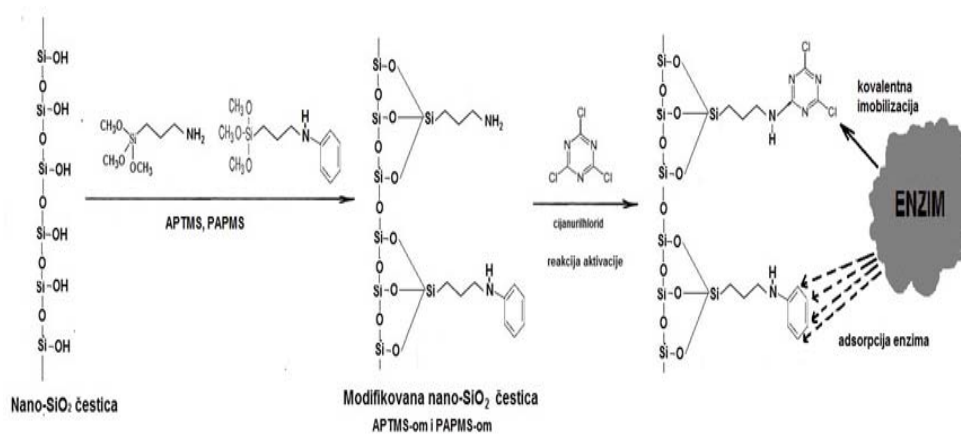
3.2.14. Imobilizacija lipaze na nano-čestice SiO₂

Nano-čestice SiO₂ su pre imobilizacije modifikovane tretiranjem sa dva različita silana (APTMS-om i PAPMS-om), kao i njihovim smešama (PAPMS:APTMS = 30:70 % i PAPMS:APTMS = 70:30 %) (slika 3.3.). Uslovi primenjeni za modifikaciju nosača i imobilizaciju lipaze prethodno su optimizovani na Katedri za biohemisjko inženjerstvo i biotehnologiju (210).

U balone od 100 mL su stavljane čestice i silan u masenom odnosu 1:1. Na 300 mg nosača dodavano je 1,18 mL APTMS-a, 1,19 mL PAPMS-a, 0,357 mL PAPMS-a i 0,817 mL APTMS-a, odnosno 0,833 mL PAPMS-a i 0,35 mL APTMS-a. U sve smeše je dodato po 36 mL toluena i dovođen je azot, a sama modifikacija izvođena na sobnoj temperaturi u toku 48 h na magnetnoj mešalici pri 600 obrtaja min⁻¹. Nakon završene modifikacije, nosač je filtriran pod vakuumom, ispiran 3 puta sa po 5 mL toluena i tretiran ultrazvukom u cilju

uklanjanja neproreagovanih silana. Ovako modifikovana i prečišćena silika dispergovana je u etanolu. Nosači na čiju su površinu tretiranjem sa APTMS-om uvedene amino-grupe dalje su modifikovani cijanurilhloridom (CC) i to pod takvim uslovima koji obezbeđuju nastanak monosupstituenata kod kojih je prilaz molekula lipaze do atoma hlora, pa samim tim i ostvarivanje kovalentne veze, neometan. Proces je izvođen u toku 2 h na magnetnoj mešalici pri 400 obrtaja min^{-1} na 0 °C pri masenom odnosu nosača i cijanurilhlorida 1:5. Smeša se sastojala iz 1 g cijanurilhlorida, 200 mg nano-čestica, 70 mL acetona i 50 μL trietilamina. Nakon završene aktivacije, nosač je odvajan vakuum-filtracijom, ispiran 3 puta sa po 5 mL acetona i sušen u vakuum-sušnici do konstantne mase. Nakon toga je vršena imobilizacija CAL B na dobijene aktivirane nosače. Smeša se sastojala iz 10 mg nano-čestica SiO_2 i količine lipaze od 24,68 mg proteina po gramu nosača, a dopunjavana je do 1 mL 50 mM ili 1 M natrijum-fosfatnim puferom pH = 7. Imobilizacija je trajala 1 h kada su korišćeni nosač aktiviran PAPMS-om i neaktivirana silika, dok je u ostalim slučajevima proces trajao 24 h. Proces se odigravao na sobnoj temperaturi uz orbitalno mešanje, nakon čega je imobilisani enzim odvajan centrifugiranjem u toku 10 min pri 13000 obrtaja min^{-1} . Nakon toga je imobilizat ispiran 3 puta sa po 1 mL pufera u kome je vršena imobilizacija, a posle svakog ispiranja ponavljan je postupak centrifugiranja. Na kraju je CAL B imobilisana na nano-čestice SiO_2 sušena pod vakuumom i korišćena u daljim eksperimentima.

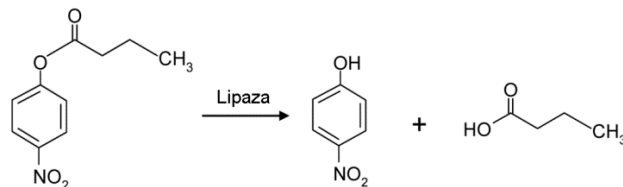




Slika 3.3. Modifikacija nano-čestica SiO₂ PAPMS-om, APTMS-om i CC-om i smešom APTMS/PAPMS i CC-om (210).

3.2.15. Određivanje hidrolitičke aktivnosti

Aktivnost imobilisanih enzimskih preparata određivana je u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil-butirata (*p*-NPB – *p*-nitrophenyl butyrate). Kao rezultat delovanja lipaze nastaju buterna kiselina i žuto obojeni *p*-nitrofenol (slika 3.4.).



Slika 3.4. Hidroliza *p*-nitrofenil-butirata katalizovana lipazom.

Stok rastvor *p*-NPB-a u dioksanu (50 mM) neposredno pre upotrebe je razblaživan 25 mM fosfatnim puferom pH=8, 125 puta do finalne koncentracije od 0,4 mM. Kada je određivana aktivnost imobilizata smeša se sastojala iz različitih masa biokatalizatora i 3 mL razblaženog supstrata. U toku merenja, smeša je mešana magnetnim zrnom (6 mm) na magnetnoj mešalici pri 1000 obrtaja min⁻¹. Pri ovakvim uslovima nisu primećene nikakve promene mehaničkih karakteristika čestica nosača. Merenja su vršena spektrofotometrijski na 410 nm u toku 2-5 min na svakih 10-30 s na 25 °C. Prinos aktivnosti je izračunavan kao odnos vezane i unete aktivnosti po gramu nosača.

3.2.16. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu

Koncentracija proteina u supernatantu, pre i nakon imobilizacije, određivana je primenom metode po Bredfordu. Smeša se sastojala iz 2 mL Bredfordovog reagensa i 40 μL

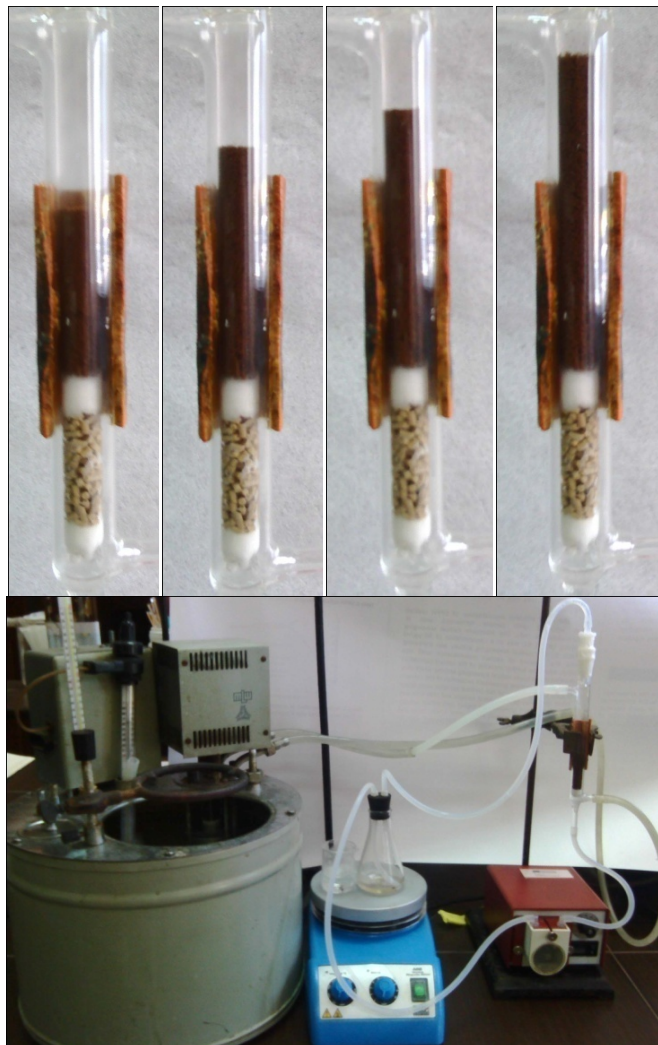
ispitivanog uzorka, a merenja su vršena spektrofotometrijski na 595 nm nakon 5 min. Količina vezanih proteina određivana je kao razlika između početne i količine proteina zaostale u supernatantu nakon imobilizacije. Prinos imobilizacije je predstavljao odnos između vezane i unete količine proteina po gramu nosača, a specifična aktivnost odnos vezane aktivnosti i vezanih proteina.

Sam reagens pripreman je na sledeći način: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 se rastvori u 50 mL 95 % etanola, doda se 100 mL 85 % fosforne kiseline i razblaži do 1 L destilovanom vodom. Nakon toga se, neposredno pre upotrebe, rastvor filtrira i čuva u tamnoj boci, ne duže od jednog meseca. Standardna prava konstruisana je za svaku novu količinu pripremljenog Bredfordovog reagensa primenom albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije 0,1-1 mg mL⁻¹.

3.2.17. Enzimska sinteza L-askorbil-oleata u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem imobilisane lipaze i recirkulacijom supstrata

Kada je reakcija sinteze L-askorbil-oleata izvođena u semi-kontinualnom sistemu, primenjen je stakleni cevni bioreaktor dimenzija 136 mm (dužina) × 9 mm (unutrašnji prečnik) i odgovarajuće zapremine od 8,7 mL opremljen plaštom kroz koji je proticala voda predgrejana na 60 °C. Kolona je punjena različitim količinama lipaze, dok je zapremina reakcione smeše koja je zagrevana do 60 °C uz mešanje u erlenmajeru na magnetnoj mešalici bila konstantna – 40 mL i sastojala se iz 50 mM vitamina C, različitih količina oleinske kiseline i *t*-butanola. Ova smeša je upumpavana u reaktor sa biokatalizatorom posredstvom peristaltičke pumpe pri različitim protocima koji su omogućavali različite hidrodinamičke uslove i formiranje fluidizovanog sloja različitih karakteristika, a smeša je semi-kontinualno recirkulisana tako što je nakon izlaska iz reaktora povratnim tokom odvođena u rezervoar sa mešanjem i ponovo upumpavana na početak kolone. Fotografija formiranja fluidizovanog sloja i fotografija korišćene aparature prikazane su na slici 3.5.

U određenim vremenskim trenucima uzorkovano je po 50-100 µL reakcione smeše iz erlenmajera i analize su vršene na HPLC uređaju. Kada je imobilisani enzim korišćen u konsektivnim reakcionim ciklusima, postupak odvajanja i ispiranja bio je identičan kao kada je reakcija izvođena u šaržnom sistemu (poglavlje 3.2.7.).



Slika 3.5. Formiranje fluidizovanog sloja čestica i korišćena aparatura.

3.2.18. Određivanje masnokiselinskog sastava masti i ulja

Masnokiselinski sastavi kokosovog ulja i svinjske masti, s obzirom na to da nisu bili definisani proizvođačkom specifikacijom, bili su utvrđeni u dva koraka. Ovi supstrati su prvo prevedeni u smeše metil-estara, a zatim je udeo svake od masnih kiselina određivan hromatografski. Prvi korak, metilovanje, vršen je na sledeći način: 4 g supstrata je stavljano u šlifovani balon od 100 mL sa 50 mL bezvodnog metanola i 1 mL 1 M KOH u metanolu. Vršeno je zagrevanje na magnetnoj mešalici sa povratnim hladnjakom uz ključanje u toku 2 h. Nakon toga je dodavano 30 mL vode preko hladnjaka, pa je smeša prebacivana u levak za odvajanje i balon ispiran sa po 20 mL vode i hloroforma. Kada se sve prebaci u levak, smeša se energično promućka i metil-estri se sakupljaju u donjoj, hloroformskoj, fazi. Ova faza se nakon odvajanja ispira dva puta sa po 10 mL vode, nakon čega se podvrgava

sušenju iznad bezvodnog natrijum-sulfata. Zatim je nerazblaženi uzorak propuštan kroz HPLC sistem u istom režimu u kome su analizirani i standardi čistih komercijalnih metil-estara. Primenjena je elucija sa gradijentom pri čemu je mobilna faza A bila smeša vode i acetonitrila (AN:H₂O:HCOOH = 85:15:0,1 %), dok je faza B bio čist izopropanol (IP). Utvrđeno je da se najbolje razdvajanje ostvaruje na sledeći način: 0-10 min 0 % B, 10-35 min 0-100 % B, 35-35,1 min 100-0 % B i 35,1-43 min 0 % B. C18 kolona bila je termostatirana na 50 °C, a radni protok je bio 0,7 mL min⁻¹.

3.2.19. Statističke analize

Svi eksperimenti izvođeni su u duplikatu i prikazani rezultati su izražavani kao srednje vrednosti ili srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Signifikantnost uticaja variranih parametara u ispitivanim opsezima na odabrane odzive određivana je za $p < 0,05$ korišćenjem jednodimenzione analize varijansi ANOVA i Studentovog *t*-testa. Ove analize vršene su primenom Microsoft Office Excell 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) softvera. Ostvaren je visok stepen ponovljivosti rezultata s obzirom na to da su standardne devijacije bile manje od 5 % u svim eksperimentima.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

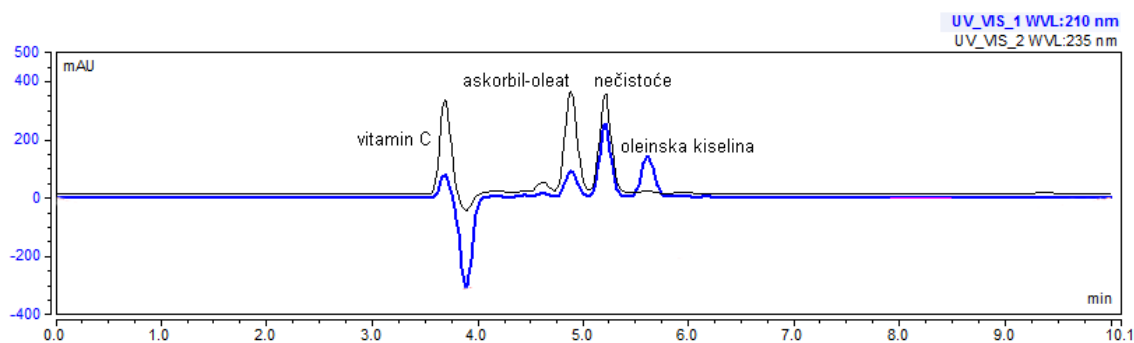
4.1. Preliminarni eksperimenti

4.1.1. *Analitičko i semipreparativno odvajanje askorbil-oleata primenom HPLC metode i spektralna analiza*

U prvom eksperimentu izvedenom u okviru ove doktorske disertacije fokus je bio na razvijanju brze i efikasne metode za detekciju, kvantifikaciju i karakterizaciju proizvoda pa je urađen preliminarni eksperiment u uslovima koji su smatrani najpogodnijim nakon pregleda literature. Pošto u naučnoj literaturi prevladavaju radovi u kojima je za enzimsku sintezu askorbil-estara upotrebljen Novozym[®] 435, ovaj komercijalni enzim je primenjen i u preliminarnom eksperimentu sinteze askorbil-oleata pri sledećim uslovima: koncentracija vitamina C 0,1 M, molnski odnos supstrata 1:6, koncentracija enzima 1 %(w/v), temperatura 55 °C i rastvarač *t*-butanol. Ovi uslovi su odabrani jer se može očekivati značajna količina proizvoda, ali i neproreagovalog limitirajućeg supstrata (vitamin C) pa se u ovim uslovima može proveriti rezolucija metode za odvajanje i kvantifikovanje estera primenom RP-HPLC analiza. Razvoj metode je krenuo od metoda sa eluiranjem gradijentom metanola (80-100 %) i vode (20-0 %) koji je omogućio odlično razdvajanje neproreagovalih supstrata (askorbinske i oleinske kiseline) i proizvoda (askorbil-oleata). U narednoj fazi razvoja metode ispitana je mogućnost zamene elucije sa gradijentom sastava mobilne faze izokratskom elucijom jer se time skraćuje trajanje pojedinačne analize i izbegava uravnotežavanje sastava mobilne faze u koloni između dve hromatografske analize. Optimalno razdvajanje proizvoda u prihvatljivo kratkom vremenu (do 6 min) ostvareno je sa čistim metanolom kao mobilnom fazom. Tipičan hromatogram prikazan je na slici 4.1.

Nakon toga je razvijena metoda za semipreparativno odvajanje proizvoda kojim bi se izolovala količina dovoljna za određivanje NMR spektara kojima bi se potvrdilo da je izolovano jedinjenje upravo L-askorbil-oleat, kao i za konstruisanje standardne prave za određivanje koncentracije proizvoda. Sama metoda za semipreparativno odvajanje, kao i procedura NMR analiza, detaljno su opisane u poglavlju 3.2.5. i 3.2.6. Dobijen je sledeći NMR spektar: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5,34 (2H), δ 4,77 (1H), δ 4,32 (1H), δ 4,20 (2H), δ 2,35 (2H), δ 2,02 (4H), δ 1,60 (2H), δ 1,28 (20H), δ 0,88 (3H). Karakteristične

funkcionalne grupe su potvrđene primenom ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): (CO-O estarska 170,05 ppm; CO 174,20 ppm; enolna C 154,15 i 118,36 ppm; $\text{CH}=\text{CH}$ 130,00 ppm). Na ovaj način je spektralnom analizom potvrđeno da je izolovana supstanca identična oleoil-estru L-askorbinske kiseline.



Slika 4.1. Tipičan hromatogram reakcione smeše nakon sinteze askorbil-oleata iz vitamina C i oleinske kiseline.

Kada su umesto oleinske kiseline kao donori acil-ostatka korišćene druge masne kiseline, metode razdvajanja su prilagođavane pojedinačnim slučajevima, tako da je za određivanje askorbil-acetata i -kaponata mobilna faza bila 70 % MeOH u vodi, za -kaprinat i -miristat 90 % MeOH, dok su -stearat i -linolat odvajani sa 100 % MeOH.

4.1.2. *Skrining lipaza kao potencijalnih katalizatora sinteze L-askorbil-oleata*

U okviru preliminarnih eksperimenata, ispitana je i mogućnost korišćenja različitih komercijalnih enzimskih preparata za dobijanje L-askorbil-oleata. Pored Novozym[®]-a 435 (sa aktivnošću ≥ 5000 PLU g^{-1}), testirane su i lipaze sledećih producenata: *R. miebei* (imobilisana na Immobead 150 sa aktivnošću ≥ 300 TBU g^{-1}), *T. lanuginosus* (imobilisana na Immobead 150 sa aktivnošću ≥ 3000 TBU g^{-1}) i *C. rugosa* (CRL, liofilizovani prah sa aktivnošću > 2000 TOU g^{-1}), a ostvareni rezultati prikazani su u tabeli 4.1. Uočava se da CRL ne pokazuje nikakvu esterifikacionu aktivnost u ovoj reakciji, korišćenjem RML je sintetisana veoma niska koncentracija proizvoda, dok su TLL i CAL B pokazale određenu aktivnost, pa je ostvaren stepen konverzije od 10,4 i 24,8 %, redom. I u ranijim istraživanjima CAL B se pokazala superiornom u odnosu na ostale primenjivane lipaze, iako su pojedini autori, prvenstveno zbog visoke cene ovog preparata, nakon skrininga različitih lipaza za rad birali druge preparate (uglavnom imobilisane forme RML i TLL). Međutim, rezultati prikazani u tabeli 4.1. pokazuju da razlika u ceni između preparata CAL

B i ostalih primenjenih (cena TLL i RML oko 2,5 puta niža od CAL B) nije proporcionalna razlici u pokazanoj aktivnosti i da bi za postizanje konverzija uporedivih sa maksimalnim ostvarenim u okviru ovog eksperimenta morala biti utrošena značajno veća količina jeftinijeg preparata. Iz tog razloga se ni sa ekonomskog aspekta upotreba ostalih testiranih preparata ne može smatrati opravdanom i u daljem radu je stoga primenjivana lipaza producenta *C. antarctica*.

Tabela 4.1. Aktivnost različitih lipaza u reakciji sinteze askorbil-oleata.

Lipaza	CAL B	TLL	RML	CRL
Aktivnost	5000 PLU g ⁻¹	3000 TBU g ⁻¹	300 TBU g ⁻¹	2000 TOU g ⁻¹
Cena*, € g ⁻¹	23,5	9,55	9,21	22,28
Stepen konverzije, %	24,8	10,4	0,36	0

* - izvor <http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html>. Reakcije su izvođene u *t*-butanolu u toku 24 h na 55 °C, sa 0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline i 0,12 %(v/v) vode. Količine lipaze ~0,235 € mL⁻¹.

4.2. Izbor organskog rastvarača i donora acil-ostatka za enzimsku sintezu L-askorbil-estara

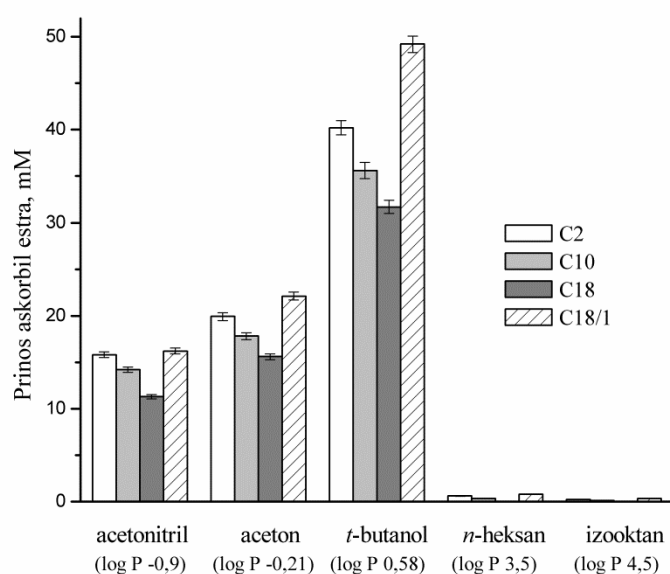
Izbor organskog rastvarača koji će predstavljati pogodnu sredinu za reakciju sinteze askorbil-estara masnih kiselina katalizovanu lipazama je značajan sa aspekta postizanja visokih prinosa proizvoda, kao i sa stanovišta kompatibilnosti sa ciljem krajnje primene. Nalaženje odgovarajućeg medijuma, stoga je zasnovano na testiranju što većeg broja organskih rastvarača različitih polarnosti i usmeravanju pretrage ka rastvaračima koji poseduju GRAS status. Pored toga, izvršen je skrining različitih donora acil-ostatka, s obzirom na značajan uticaj dužine ugljovodoničnog lanca i stepena nezasićenosti kiseline na afinitet CAL B, kao i liposolubilost i antioksidativnu aktivnost rezultujućih askorbil-estara.

4.2.1. Uticaj organskog rastvarača na sintezu askorbil-estara karboksilnih kiselina

Da bi bio ispitan uticaj reakcionog medijuma i pronađen najpogodniji organski rastvarač, reakcija sinteze askorbil-estara karboksilnih kiselina koje poseduju različit broj C atoma (2-18) izvođena je u velikom broju rastvarača čije su log P vrednosti veoma različite, dok su svi ostali reakcioni parametri bili konstantni. Na slici 4.2. su prikazani prinosi sva četiri sintetisana estra (askorbil-acetata, -kaprinata, -stearata i -oleata) postignuti u testiranim rastvaračima. ANOVA testom potvrđena je signifikantnost ($p < 0,01$) oba faktora – vrsta organskog rastvarača i masne kiseline. Očigledno je da hidrofobni organski rastvarači ne obezbeđuju pogodne uslove za esterifikaciju vitamina C, nezavisno od polarnosti donora acil-ostatka, tako da se reakcija odigravala samo u rastvaračima čiji je log P niži - *t*-butanolu, acetonu i acetonitrilu.

Iako su izrazito hidrofobni rastvarači uglavnom prvi izbor za sintezu estara katalizovanih lipazama (143, 144, 154, 211), estri vitamina C su u dosadašnjim publikacijama uspešno sintetisani uglavnom u polarnijim medijumima (14, 212), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Kada se u obzir uzme činjenica da je eksperimentom bilo obuhvaćeno više donora acil-ostatka širokog opsega polarnosti (log P od -3,5 do 8,2), a da je sinteza uspešno izvedena samo u polarnim rastvaračima, može se pretpostaviti da je rastvorljivost vitamina C u reakcionom sistemu ključni faktor za efikasno katalitičko delovanje enzima. Najčešće korišćeni rastvarači su tercijarni alkoholi – *t*-butanol i *t*-amil alkohol (43, 48, 50, 125, 159), zatim aceton (44, 52, 137, 139) i, u nekoliko slučajeva, acetonitril (52, 140, 213).

Nešto viši prinosi su, generalno, prijavljivani u tercijarnim alkoholima u kojima je, iako imaju veći log P od acetona, vitamin C bolje rastvoran (rastvorljivost u *t*-amil alkoholu 14,6 mg mL⁻¹, *t*-butanolu 4,9 mg mL⁻¹, acetonu 2,8 mg mL⁻¹ i acetonitrilu 1,1 mg mL⁻¹) U skladu sa tim su i rezultati naših eksperimenata koji jasno pokazuju da daljim povećanjem polarnosti rastvarača nakon *t*-butanola, dolazi do pada koncentracije proizvedenih estara. U nekoliko istraživanja, najveća aktivnost lipaze ostvarena je kada je korišćena smeša jednog hidrofobnog i jednog hidrofilnog rastvarača, dok se u drugim studijama primena takvih medijuma pokazala nepogodnom (43).



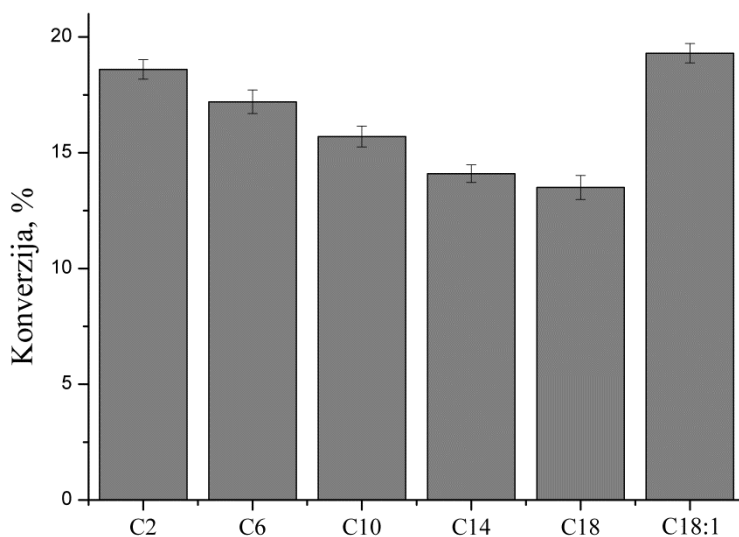
Slika 4.2. Uticaj organskog rastvarača na prinos askorbil-estara masnih kiselina. Reakcije su izvođene u toku 24 h na 55 °C, sa 0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline, 1 %(w/v) enzima i 0,12 %(v/v) vode.

Iako su u ovoj fazi istraživanja najbolji rezultati ostvareni u *t*-butanolu, dalja optimizacija vršena je u acetonu, u kome su takođe postignuti obećavajući prinosi. Aceton spada u jeftine i dostupne rastvarače, može se uparavanjem lako ukloniti iz reakcione smeše, što smanjuje utroške energije pri izolovanju i prečišćavanju proizvoda, a poseduje i GRAS status (dozvoljena koncentracija do 8 mg L⁻¹ (214) u prehrambenim proizvodima) koji njegovu upotrebu pri dobijanju jedinjenja namenjenih ishrani ljudi čini bezbednom. Uzimajući u obzir navedene prednosti korišćenja acetona kao reakcionog medijuma,

naredna ispitivanja posvećena optimizaciji sinteze askrobil-estara karboksilnih kiselina korišćenjem Novozym[®]-a 435 kao katalizatora, vršena su u ovom rastvaraču.

4.2.2. Uticaj karboksilne kiseline na aktivnost imobilisane lipaze Novozym[®] 435

Različite lipaze pokazuju različitu selektivnost prema masnim kiselinama u zavisnosti od dužine njihovog ugljovodoničnog lanca i stepena nezasićenosti. U isto vreme, estri dobijeni korišćenjem acil-donora različite polarnosti i sami poseduju različite osobine koje ih čine pogodnim za upotrebu u drugačijim sistemima. U okviru ove doktorske disertacije, kao donori acil-ostatka, korišćene su zasićene masne kiseline sa brojem C atoma od 2 do 18, kao i oleinska kiselina koja poseduje 18 C atoma i jednu dvostruku vezu. Sve reakcije su izvođene u acetonu na 55 °C u toku 72 h pri koncentraciji vode 0,12 %(v/v), sa 0,05 M vitamina C, 0,15 M kiseline i 10 g L⁻¹ enzima. Prema ANOVA analizi, dužina lanca masne kiseline je veoma signifikantan faktor ($p < 0,1$) u sintezi estara vitamina C. Sa slike 4.3. na kojoj su prikazani dobijeni rezultati, može se uočiti postepen pad prinosa (od 18,6 do 13,5 %) sa povećanjem dužine lanca donora acil-ostatka od 2 do 18 C atoma. Pored toga, sa oleinskom kiselinom koja poseduje isti broj C atoma kao stearinska kiselina, ali je mononezasićena, postignuta je najveća konverzija u poređenju sa svim ostalim ispitanim acil-donorima. Značaj prisustva dvostruke veze u ugljovodoničnom lancu donora acil-ostatka, potvrđen je i Studentovim testom za stearinsku i oleinsku kiselinu ($p=0,015$).



Slika 4.3. Uticaj dužine ugljovodoničnog lanca i stepena nezasićenosti masne kiseline na biosintezu L-askorbil-estara. Reakcije su izvođene u toku 72 h na 55 °C, sa 0,05 M vitamina C, 0,15 M oleinske kiseline, 1 %(w/v) enzima i 0,12 %(v/v) vode.

U prethodnim istraživanjima u kojima je ispitivana specifičnost lipaze CAL B prema kiselinama različite dužine lanca, dobijeni su veoma oprečni rezultati. Tako je u studiji koju je sproveo Song sa saradnicima utvrđeno da Novozym[®] 435 pokazuje veći afinitet ka dužim masnim kiselinama (C18>C16>C12), a povećanje broja dvostrukih veza je takođe dovodilo da postizanja većih početnih brzina i krajnjih prinosa u reakciji sinteze askorbil-estara (135). Sa druge strane Stamatis i saradnici su demonstrirali da CAL B pokazuje izraženu selektivnost prema masnim kiselinama koje poseduju 12-18 C atoma, pri čemu su bolji rezultati postignuti sa acil-donorima kraćeg lanca (49). Sličan trend prijavljuju i Jan i saradnici pri korišćenju drugog komercijalnog imobilizata CAL B – Chirazyme[®] L-2 C2 (127), dok je Vatanabe sa kolegama ustanovio da broj C atoma masne kiseline nema efekat na sintezu L-askorbil-estara katalizovanu istim enzimom (148).

Estri L-askorbinske kiseline dobijeni primenom različitih acil-donora razlikuju se i u osobinama što utiče na oblast njihove primene. Ciljanom lipofilizacijom vitamina C esterifikacijom sa karboksilnim kiselinama različite dužine lanca (2-18 C atoma) se mogu dobiti estri čije su vrednosti HLB brojeva veoma različite što omogućava njihovu primenu kao površinski aktivnih materija u raznovrsnim sistemima. Izračunavanjem HLB brojeva prema Dejvisovoj jednačini (poglavlje 2.4.1.1.) zaključeno je da se askorbil-estri sa manje od 10 C atoma u bočnom nizu mogu svrstati u hidrosolubilne PAM, oni koji poseduju 10-14 C atoma u bočnom lancu mogu biti dispergovani u vodi, dok se askorbil-estri koji poseduju više od 14 C atoma u bočnom lancu mogu smatrati liposolubilnim PAM. Estri nastali u reakciji sa acil-donorima veće dužine (12-18 C atoma) mogu se primenjivati kao antipenušavci. Askorbil-estri sa 14 i više C atoma u bočnom nizu mogu se uspešno koristiti pri pravljenju emulzija tipa voda u ulju, dok se u emulzijama tipa ulje u vodi mogu upotrebljavati askorbil-estri sa kraćim (C12 i kraći) acil-ostatkom. Uvođenjem kratkog acil-ostatka ostvaruje se samo delimična lipofilizacija L-askorbinske kiseline, koja je i primarni razlog njene esterifikacije. Ipak, ova jedinjenja se, u zavisnosti od primenjene koncentracije, mogu koristiti kao antioksidansi u uljima, emulzijama i lipozomima. Pored toga, askorbil-estri sa kratkim bočnim lancem (C2-C4) se mogu primeniti i u deterdžentima. Sa druge strane, hidrofobniji askorbil-estri se smatraju efikasnijim kada se koriste kao aditivi u lipofilnim proizvodima u niskim koncentracijama. Ukoliko poseduju bočni lanac srednje dužine (C10-C14), askorbil-estri se mogu koristiti i kao agensi za kvašenje. S obzirom na zadovoljavajuću aktivnost Novozym[®]-a 435 u reakciji esterifikacije vitamina C zasićenim

masnim kiselinama različite dužine lanca, kao i mononezasićenom, oleinskom kiselinom, svi ispitani acil-donori su razmatrani za dalju optimizaciju procesa.

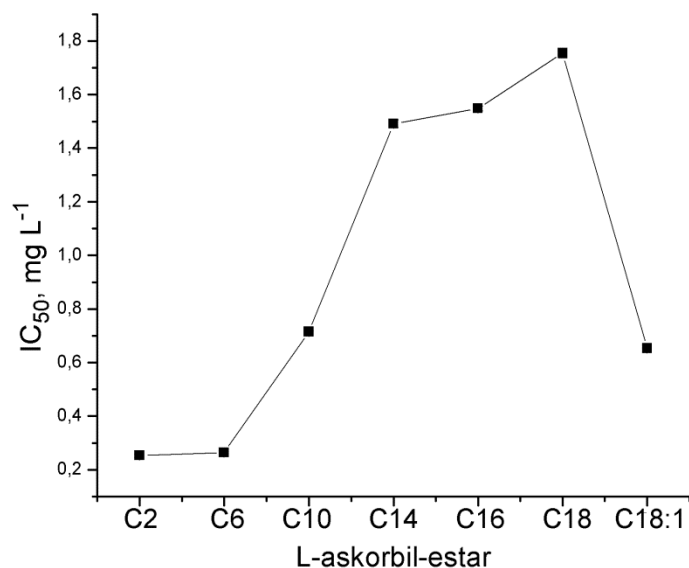
4.2.3. Uticaj acil-ostatka na antioksidativnu aktivnost askorbil-estara

Da bi sintetisani L-askorbil-estri bili okarakterisani sa aspekta antioksidativne aktivnosti, ispitivana je njihova sposobnost inhibiranja DPPH radikala. U tom cilju, testirano je svih šest proizvedenih estara, vitamin C, kao i komercijalni L-askorbil-palmitat. Ostvareni rezultati su predstavljeni u tabeli 4.2., iz koje se može videti da svi ispitani estri poseduju visok kapacitet za “hvatanje” slobodnih radikala. Međutim, sprovođenjem ANOVA testa ustanovljeno je da postoji statistički značajna razlika u njihovim antioksidativnim karakteristikama ($p < 0,05$). Analiziranjem odgovarajućih IC_{50} vrednosti askorbil-estara dobijenim u reakciji sa zasićenim masnim kiselinama, može se uočiti trend opadanja kapaciteta za vezivanje slobodnih radikala sa povećanjem broja C atoma acil-donora (slika 4.4.). Interesantno je da je među askorbil-estrima veće dužine lanca veću antioksidativnu aktivnost od svih askorbil-estara sa zasićenim acil-ostatkom pokazao estar vitamina C sa mononezasićenom, oleinskom kiselinom. Nekoliko estara, i to acetat, kapronat, kaprinat i oleat, su čak pokazali poboljšane antioksidativne karakteristike u odnosu na vitamin C, kada su rezultati izraženi u $mg L^{-1}$, dok se poređenjem IC_{50} vrednosti iskazanih preko koncentracije u μM vidi da se u slučaju svih proizvoda esterifikacijom vitamina C njegova antioksidativna aktivnost povećala.

Tabela 4.2. Kapacitet L-askorbil-estara i vitamina C za vezivanje DPPH radikala.

Jedinjenje	log P*	IC_{50} , $mg L^{-1}$	IC_{50} , μM
L-askorbil-acetat	-0,698	$0,253 \pm 0,007$	$1,16 \pm 0,032$
L-askorbil-kapronat	1,232	$0,264 \pm 0,005$	$0,963 \pm 0,018$
L-askorbil-kaprinat	3,253	$0,715 \pm 0,008$	$2,16 \pm 0,024$
L-askorbil-miristat	5,274	$1,491 \pm 0,014$	$3,86 \pm 0,036$
L-askorbil-palmitat	6,28	$1,548 \pm 0,006$	$3,73 \pm 0,014$
L-askorbil-stearat	7,295	$1,754 \pm 0,018$	$3,96 \pm 0,041$
L-askorbil-oleat	6,809	$0,653 \pm 0,008$	$1,48 \pm 0,018$
L-askorbinska kiselina	-1,4	$0,812 \pm 0,009$	$4,6 \pm 0,051$

* - log P vrednosti izračunate korišćenjem Molinspiration online softvera (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>)

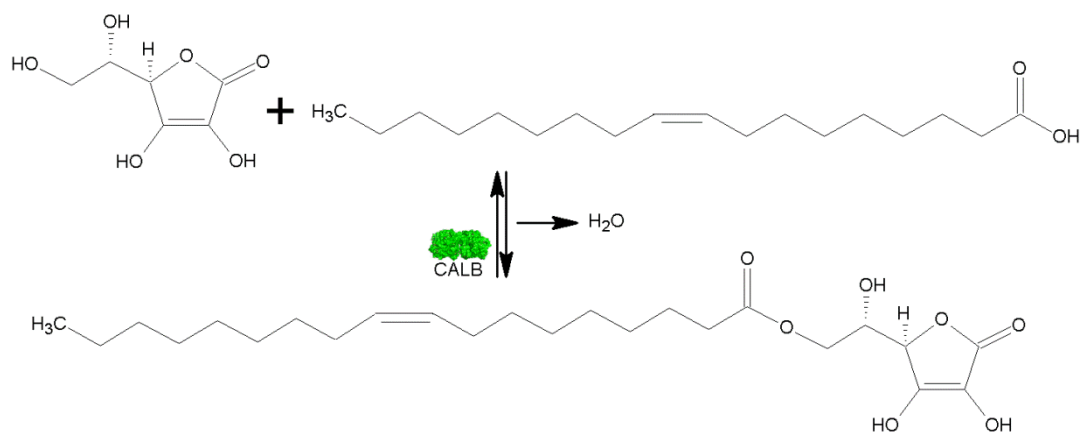


Slika 4.4. Uticaj dužine i stepena nezasićenosti acil-ostatka na antioksidativno dejstvo L-askorbil-estara karboksilnih kiselina.

U okviru prethodnih istraživanja dobijeni su veoma različiti rezultati kada je u pitanju antioksidativna aktivnost askorbil-estara. Lo Nostro sa saradnicima je DPPH metodom pokazao da širok spektar L-askorbil-estara, derivata vitamina C i zasićenih masnih kiselina (C8-C18), poseduje veoma sličan kapacitet za vezivanje slobodnih radikala, kao i da su njihova antioksidativna svojstva nepromenjena u odnosu na sam vitamin C (15, 191). Nasuprot tome, prethodno je prijavljeno da L-askorbil-palmitat poseduje 10, a smeša askorbil-estara dobijenih iz palminog ulja 100 puta manju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa vitaminom C (48). Primenom TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity-antioksidativni kapacitet ekvivalenta troloksa) i ubrzanog testa oksidabilnosti (Rancimat test) je, sa druge strane, pokazano da askorbil-estri oleinske i palmitinske kiseline poseduju isti kapacitet za vezivanje slobodnih radikala, ali nešto manji nego L-askorbinska kiselina (50). Kada je u pitanju antioksidativna aktivnost L-askorbil-oleata, dobijeni rezultat koji ukazuje na njegov visok kapacitet za vezivanje DPPH radikala nije neočekivan s obzirom na podatke dostupne u literaturi, gde je okarakterisan kao liposolubilni antioksidans velikog potencijala (46, 50, 215). Viklund sa saradnicima je tako objavio da je askorbil-oleat efikasniji od palmitata u sprečavanju formiranja peroksida u repičinom ulju (46). U skladu sa tim su i rezultati druge studije u kojoj je pokazano da askorbil-oleat ima bolji zaštitni efekat na ljudske endotelijalne venske ćelije iz pupčane vrpce od drugih askorbil-derivata (215).

4.3. Optimizacija reakcionih uslova za sintezu askorbil-oleata

Nalaženje optimalnih vrednosti ključnih reakcionih parametara bilo kog procesa je veoma značajno jer se na taj način ostvaruje povećanje njegove konkurentnosti i ekonomskog potencijala. U skladu sa tim, vršena je optimizacija svih značajnih reakcionih faktora u reakciji acilovanja L-askorbinske kiseline oleinskom kiselinom katalizovanom imobilisanom lipazom (slika 4.5.). Oleinska kiselina je izabrana kao acil-donor za ove eksperimente pošto je u prethodnom poglavlju utvrđeno da biokatalizator ima veliki afinitet prema ovom supstratu, da je antioksidativno dejstvo askorbil-oleata veoma jako, kao i zbog rastućeg interesovanja za primenu askorbil-estara nezasićenih masnih kiselina.



Slika 4.5. Sinteza L-askorbil-oleata esterifikacijom vitamina C i oleinske kiseline katalizovana lipazom B iz *C. antarctica*.

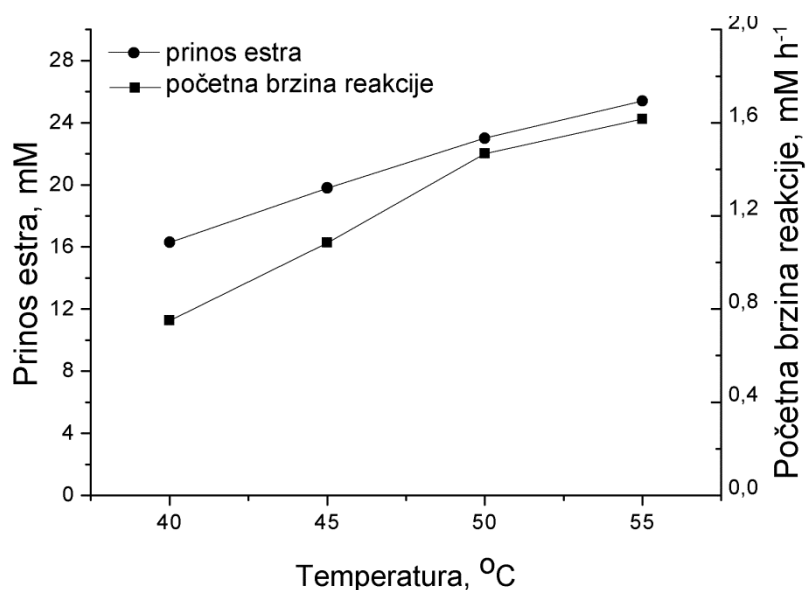
4.3.1. Uticaj reakcionih faktora na biosintezu L-askorbil-oleata

Da bi se ispitao uticaj pojedinačnih reakcionih parametara na tok enzimske sinteze askorbil-oleata, na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih testova, utvrđeni su najznačajniji faktori, kao i opsezi u kojima ih treba varirati. Kao ključni parametri izdvojeni su koncentracija enzima i supstrata, reakciona temperatura i aktivnost vode u sistemu.

4.3.1.1. Uticaj temperature na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata

Reakcije esterifikacije katalizovane lipazama, u zavisnosti od termostabilnosti primenjenog enzima, isparljivosti rastvarača, kao i prirode supstrata i proizvoda, mogu biti izvođene na različitim temperaturama. U cilju utvđivanja optimalne temperature za reakciju između oleinske i L-askorbinske kiseline katalizovanu imobilisanom lipazom CAL B proces je vođen u opsegu temperatura 40-55 °C, dok su svi ostali parametri imali konstantnu

vrednost (0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline, 10 g L⁻¹ enzima i 0,12 %(v/v) vode). Uticaj ovog faktora na početnu brzinu reakcije i prinos proizvoda nakon 24 h predstavljen je na slici 4.6. Može se uočiti da sa porastom temperature u čitavom ispitivanom opsegu dolazi do rasta oba praćena odziva. Početna brzina se povećava sa 0,751 na 1,616 mM h⁻¹, dok prinosi estera nakon 24 h reagovanja rastu od 16,3 do 25,4 mM. Kada su ostvareni rezultati analizirani primenom ANOVA testa, konstatovano je da temperatura predstavlja statistički značajan parametar sa aspekta početnih brzina reakcije, kao i koncentracije proizvedenog estera.

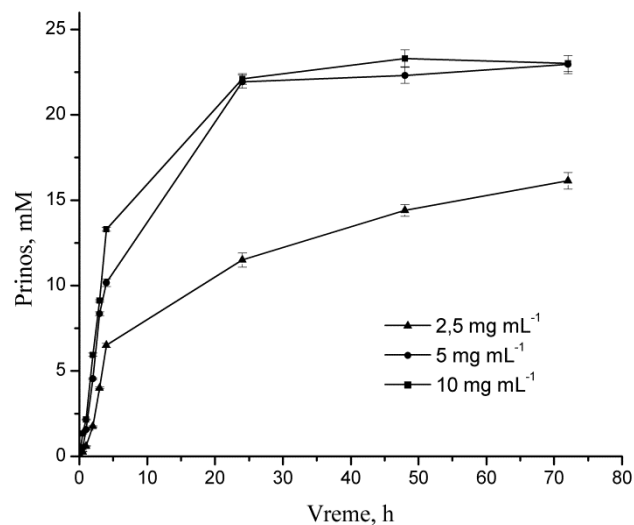


Slika 4.6. Uticaj temperature na početnu brzinu reakcije i prinos L-askorbil-oleata. Reakcija je izvođena u acetonu u toku 24 h, sa 0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline, 1 %(w/v) enzima i 0,12 %(v/v) vode.

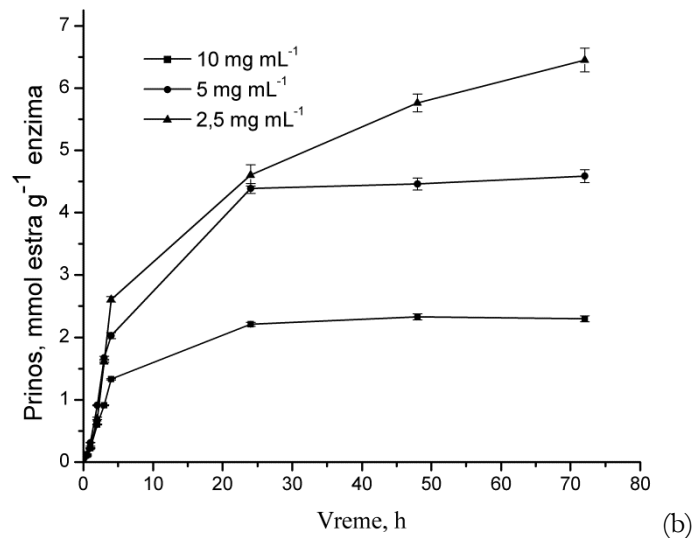
Lipaza tipa B producenta *C. antarctica* spada u lipaze visoke termostabilnosti, pa su u nekoliko studija dobijeni temperaturni optimumi od 70 °C za sintezu askorbil-estara (45). Sa druge strane, prijavljeno je da se maksimalan prinos L-askorbil-laurata postiže na znatno nižoj temperaturi – 30,6 °C (140). U najvećem broju istraživanja je, međutim, ustanovljeno da se maksimalna brzina reakcije i prinos askorbil-estara ostvaruju na temperaturama 55-60 °C (125), što je u skladu i sa rezultatima postignutim u okviru ove doktorske disertacije. Ispitivanje uticaja preostalih reakcionih faktora je, stoga, izvođeno na 55 °C, dok ispitivanje viših temperatura, s obzirom na blizinu tačke ključanja acetona (~56 °C), nije vršeno u ovoj fazi istraživanja.

4.3.1.2. Uticaj koncentracije biokatalizatora na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata

Količina enzima koja katalizuje neki proces značajno utiče na njegovu brzinu. Da bi bio ispitan uticaj koncentracije lipaze na sintezu L-askorbil-oleata u toku 72 h, njen sadržaj je variran u opsegu 2,5-10 mg mL⁻¹. Reakcija je izvođena na 55 °C, sa 0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline i pri sadržaju vode od 0,12 %(v/v). Sa slike 4.7.a se može uočiti da povećanje koncentracije enzima od 2,5 do 5 mg mL⁻¹ dovodi do primetnog povećanja početne brzine reakcije esterifikacije, dok dalje povećanje do 10 mg mL⁻¹ nema takav efekat. Iako sadržaj enzima ne utiče na položaj ravnoteže, pri višim koncentracijama (5 i 10 mg mL⁻¹) se ona postiže znatno brže, već nakon 24 h, dok je pri koncentraciji od 2,5 mg mL⁻¹ porast količine proizvedenog estera evidentan za sve vreme trajanja reakcije (72 h). Sa druge strane, kada je kao odziv analiziran prinos askorbil-oleata po masi upotrebljenog enzima, dobijen je suprotan trend (slika 4.7.b). Maksimalna količina estera od 6,5 mmol po gramu lipaze je tako sintetisana sa najnižom koncentracijom (2,5 mg mL⁻¹) Novozym[®]-a 435. S obzirom na to da je cena biokatalizatora uglavnom najznačajnija stavka u ukupnim troškovima enzimskih sinteza, a da su, sa druge strane, vremenska produktivnost i potrošnja energije, takođe značajni parametri, neophodno je pri njihovoj optimizaciji napraviti kompromis između ovih suprotstavljenih zahteva. Iz tih razloga je u narednim eksperimentima primenjena koncentracija lipaze 5 mg mL⁻¹, pri kojoj je vreme za koje je postignuta ravnoteža bilo gotovo isto kao pri duplo većoj potrošnji enzima, dok je odgovarajući specifični prinos od 4,5 mmol estera g⁻¹ Novozym-a[®] 435 bio uporediv ili viši nego u prethodnim studijama u kojima su korišćeni isti enzim i donor acil-ostatka (125, 139).



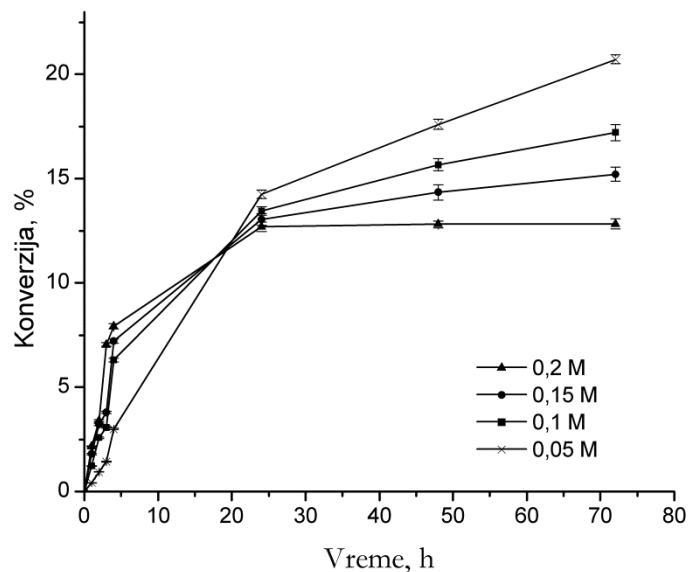
(a)



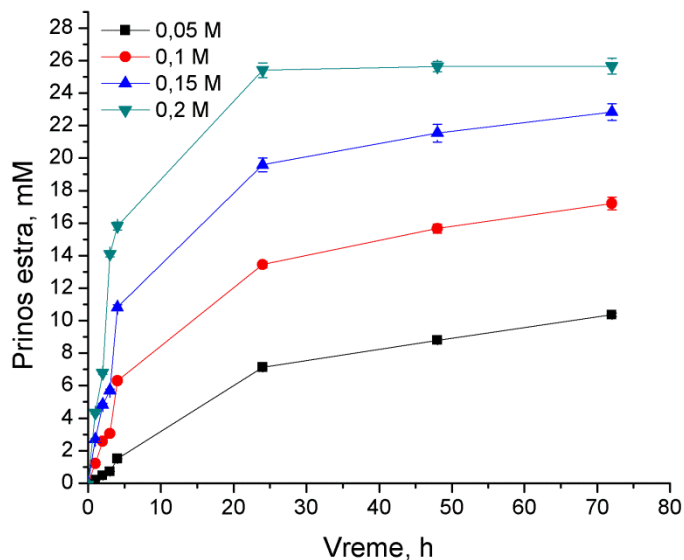
Slika 4.7. Uticaj koncentracije Novozym[®]-a 435 na (a) prinos askorbil-oleata i (b) prinos askorbil-oleata po gramu enzima. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 55 °C, sa 0,2 M vitamina C, 0,6 M oleinske kiseline i 0,12 %(v/v) vode.

4.3.1.3. Uticaj koncentracije supstrata na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata

Uticaj koncentracije supstrata je prvo ispitivan variranjem koncentracije vitamina C u opsegu 0,05-0,2 M pri fiksnom molskom odnosu od 1:3. Primenom ANOVA testa pokazano je da je koncentracija limitirajućeg supstrata izuzetno signifikantan faktor ($p < 0,01$), i sa aspekta prinosa proizvoda i sa aspekta odgovarajućih molarnih konverzija. Što se tiče stepena konverzije, kao što se uočava na slici 4.8., maksimalna vrednost postignuta je pri najnižoj koncentraciji askorbinske kiseline (0,05 M). Sa povećanjem koncentracije vitamina C dolazilo je do povećanja početne brzine reakcije, pa je tako ravnotežna konverzija ostvarivana već nakon 24 h, ali je nakon 72 h ona i dalje bila niža nego pri malim koncentracijama.



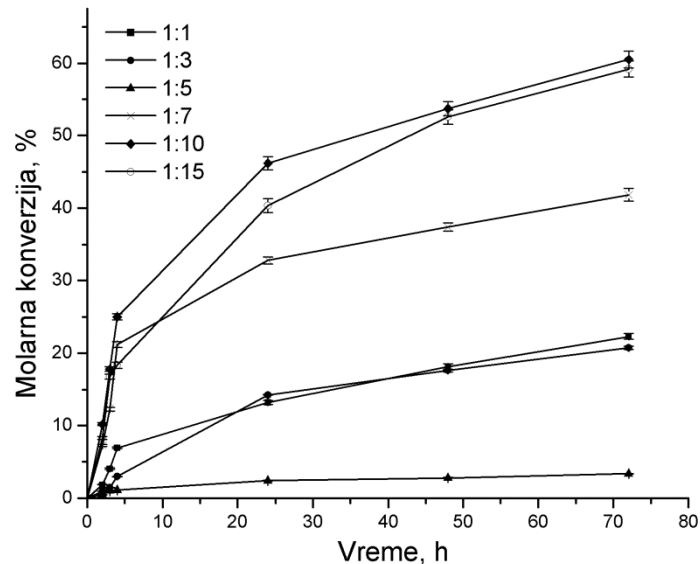
Slika 4.8. Uticaj koncentracije vitamina C na stepen konverzije. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 55 °C, sa različitim koncentracijama vitamina C i pri molskom odnosu supstrata 1:3, sa 0,5 % (w/v) enzima i 0,07 % (v/v) vode.



Slika 4.9. Uticaj koncentracije vitamina C na prinos estra. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 55 °C, sa različitim koncentracijama vitamina C i pri molskom odnosu supstrata 1:3, sa 0,5 % (w/v) enzima i 0,07 % (v/v) vode.

Pored konverzije, praćena je i koncentracija proizvoda, na koju je ovaj parametar imao suprotan efekat (slika 4.9.). Studentovim *t*-testom za parove koncentracija vitamina C utvrđeno je da jedino za par 0,15 i 0,2 M ne postoji statistički značajna razlika u ostvarenim prinosima, što ukazuje na to da se ovaj deo variranog opsega može smatrati optimalnim.

Kako ukupna prostorna produktivnost i cena postupka prečišćavanja moraju biti uzete u obzir, naročito u kasnijim fazama razvoja enzimskih procesa, jasno je da dobijanje viših koncentracija proizvoda ima veliki značaj.

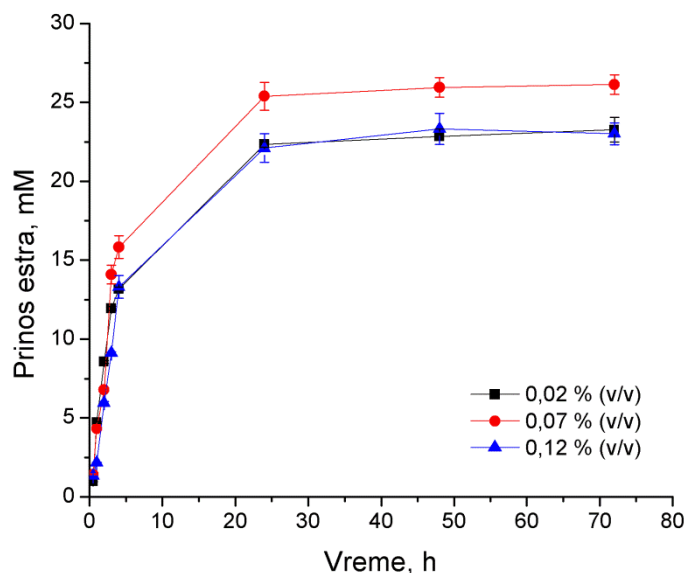


Slika 4.10. Uticaj molskog odnosa supstrata na stepen konverzije. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 55 °C, sa 0,05 M vitamina C i različitim koncentracijama oleinske kiseline, sa 0,5 %(w/v) enzima i 0,07 %(v/v) vode.

Poznato je da se značajno povećanje prinosa u reakcijama sinteze askorbil-estara masnih kiselina može postići izvođenjem reakcije sa viškom donora acil-ostatka. Da bi se ispitao uticaj molskog odnosa supstrata, pri fiksiranoj koncentraciji vitamina C (0,05 M) je variran sadržaj oleinske kiseline tako da su rezultujući molski odnosi bili u opsegu 1:1-1:15. Kao što se može videti na slici 4.10., višak acil-donora dovodi do naglog rasta postignutih stepena konverzije. Pri ekvimolarnom odnosu supstrata prinos od samo 3,6 % ostvaren je nakon 72 h, dok je pri molskom odnosu askorbinske prema oleinskoj kiselini od 1:10 ostvarena konverzija od 60,5 %, čak 16,8 puta veća. Dalje povećanje koncentracije oleinske kiseline nije dovelo do rasta prinosa, što se uglavnom pripisuje konformacionim promenama u molekulu enzima do kojih dolazi u prisustvu velikih količina oleinske kiseline koja otežava hidrofilnim molekulima vitamina C da priđu aktivnom centru lipaze (48). Studentov *t*-test je takođe pokazao da ne postoji statistički signifikantna razlika između rezultata eksperimenata izvedenih sa oleinskom kiselinom u desetostrukom i petnaestostrukum višku, pa se može zaključiti da povećanje molskog odnosa iznad 1:10 nije opravdano.

4.3.1.4. Uticaj koncentracije vode na enzimsku sintezu L-askorbil-oleata

Voda je sastavni deo reakcionih sistema u kojima se odigravaju reakcije esterifikacije čak i kada se ne dodaje u reakcionu smešu pre početka reakcije. Pored vode koja nastaje kao proizvod reakcije, svaka komponenta smeše poseduje određenu aktivnost vode, pa ukupna aktivnost vode u sistemu zavisi od vrste i koncentracije supstrata i rastvarača (216). Nastajanjem vode u toku reakcije, aktivnost vode u medijumu raste u toku vremena. Iako je, kada se kao biokatalizatori koriste lipaze neophodno postojanje esencijalnog sloja vode oko molekula enzima da bi on sačuvao otvorenu, aktivnu konformaciju, prisustvo viška vode dovodi do favorizovanja reverzne reakcije hidrolize, što onemogućava postizanje visokih prinosa (217).



Slika 4.11. Uticaj koncentracije vode na prinos L-askorbil-oleata. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 55 °C, sa 0,2 M vitamina, 0,6 M oleinske kiseline i 1 %(w/v) enzima.

Početa koncentracija vode u sistemu je u okviru ispitivanja njenog uticaja na tok biosinteze askorbil-oleata varirana između 0,02 i 0,12 %(v/v). ANOVA analiza je ukazala na to da je u odabranom opsegu ovaj faktor na granici signifikantnosti ($p \approx 0,05$), ali se sa grafika 4.11. ipak može uočiti da su nešto viša početna brzina i prinos estra ostvareni pri sadržaju vode od 0,07 %(v/v) nego pri nižoj i višoj koncentraciji. Nasuprot tome u okviru ranijih studija ustanovljeno je da Novozym[®] 435 pokazuje najveću aktivnost u medijumima sa najmanje vode ili potpuno bezvodnim sredinama (218, 219). Međutim, treba imati u vidu da je u ovom istraživanju korišćen rastvarač znatno veće polarnosti koji je, u skladu sa

tim, u stanju da rastvori esencijalni sloj vode koji okružuje molekul enzima, pa je neophodna određena dodatna količina vode (111, 220, 221).

4.3.2. Optimizacija reakcionih parametara primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina

U prethodnom poglavlju ove doktorske disertacije primenjena je konvencionalna metoda optimizovanja reakcionih uslova variranjem jednog po jednog parametra pri fiksiranim vrednostima ostalih koja, za razliku od višefaktornog eksperimentalnog planiranja, ne daje uvid u prirodu i intenzitet interakcija među faktorima (222). Metoda odzivnih površina (RSM) i centralni kompozitni rotabilni plan (CCRD) smatraju se pogodnim statističkim tehnikama za ispitivanje i optimizaciju kompleksnih procesa gde je očekivano postojanje interakcija među eksperimentalnim faktorima. Ove metode su do sada uspešno primenjivane za optimizaciju sinteza estara katalizovanih lipazama (223, 224), pri čemu je i nekoliko studija posvećenih sintezi estara vitamina C takođe izvedeno na ovaj način (45, 126, 140, 141). U svim ovim studijama izlazna veličina bila je molarna konverzija, a kao donor acil-ostatka nije korišćena oleinska kiselina.

Tabela 4.3. Kodirane i stvarne vrednosti parametara u primenjenom eksperimentalnom planu.

Eksperimentalni faktor	Kodirana vrednost				
	-2	-1	0	1	2
Sadržaj vode, X_1 (%(v/v))	0,018	0,068	0,118	0,168	0,218
Temperatura, X_2 (°C)	40	45	50	55	60
Koncentracija enzima, X_3 (%(w/v))	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Molski odnos supstrata, X_4	1:3	1:6	1:9	1:12	1:15
Koncentracija vitamina C, X_5 (M)	0,02	0,07	0,12	0,17	0,22

Optimizacija pet navedenih reakcionih parametara je vršena primenom centralnog kompozitnog rotabilnog plana sa pet nivoa vrednosti i metode odzivnih površina, pri čemu su detaljno ispitani njihovi pojedinačni uticaji i međusobne interakcije na tri odabrana odziva: stepen konverzije limitirajućeg supstrata (Y_1 , %), koncentraciju estera (Y_2 , mM) i specifični prinos proizvoda (Y_3 , mmol estera g⁻¹enzima). Eksperimentalni faktori, kao i njihove stvarne i kodirane vrednosti predstavljeni su u tabeli 4.3.

Tabela 4.4. Eksperimentalni plan sa kodiranim vrednostima variranih parametara i ostvareni rezultati.

Eksp.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Molarna konverzija (Y_1 , %)	Koncentracija estra (Y_2 , mM)	Specifični prinos (Y_3 , mmol g ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	13,89	23,62	2,95
2	1	1	1	-1	-1	35,90	25,13	3,14
3	1	1	-1	1	-1	44,05	30,83	7,70
4	1	1	-1	-1	1	18,22	30,97	7,74
5	1	1	1	1	-1	32,35	22,65	2,83
6	1	-1	1	1	1	11,53	19,60	2,44
7	1	-1	-1	1	1	7,41	12,59	3,14
8	1	-1	-1	-1	-1	29,79	20,85	5,21
9	-1	1	1	1	-1	56,97	39,88	4,98
10	-1	1	1	-1	1	22,78	38,71	4,83
11	-1	1	-1	1	1	16,44	27,94	6,98
12	-1	1	-1	-1	-1	48,96	34,27	8,56
13	-1	-1	1	1	1	9,35	15,90	1,98
14	-1	-1	1	-1	-1	30,12	21,09	2,63
15	-1	-1	-1	1	-1	44,77	31,34	7,83
16	-1	-1	-1	-1	1	20,12	34,20	8,54
17	2	0	0	0	0	21,77	26,13	4,35
18	-2	0	0	0	0	31,65	37,98	6,33
19	0	2	0	0	0	32,16	38,59	6,43
20	0	-2	0	0	0	27,99	33,59	5,5
21	0	0	2	0	0	25,09	30,11	3,01
22	0	0	-2	0	0	25,28	30,33	15,2
23	0	0	0	2	0	18,64	22,37	3,72
24	0	0	0	-2	0	17,18	20,62	3,43
25	0	0	0	0	2	9,24	20,42	3,40
26	0	0	0	0	-2	35,29	7,06	1,17
27*	0	0	0	0	0	23,93	28,72	4,78
28*	0	0	0	0	0	28,17	33,81	5,63
29*	0	0	0	0	0	27,56	33,07	5,51
30*	0	0	0	0	0	25,84	31,01	5,16
31*	0	0	0	0	0	22,93	27,51	4,59
32*	0	0	0	0	0	29,17	35,01	5,83

* - centralna tačka.

Rezultati izvedenih eksperimenata sumirani su u tabeli 4.4. iz koje se brzo može uočiti da ispitivani faktori ne pokazuju isti uticaj na ispitivane odzive. Najviše vrednosti konverzije i prinosa postignute su u eksperimentu broj 9 (55 °C, 0,8 %(w/v) lipaze, 0,07 M vitamin C, molski odnos 1:12 i sadržaj vode od 0,118 %(v/v)). Međutim, može se primetiti da su visoke konverzije postignute isključivo pri nižim koncentracijama L-askorbinske kiseline (eksperimenti 3, 12 i 15), dok je visok prinos estra ostvaren pri znatno većoj koncentraciji

limitirajućeg supstrata (eksperiment 10). Najveća vrednost specifičnog prinosa je, sa druge strane, dobijena u eksperimentu broj 22.

Sva tri odziva fitovana su polinomima drugog stepena i adekvatnost sva tri regresiona modela (jednačine 4.1., 4.2. i 4.3.) je potvrđena Fišerovim testom pošto su F -vrednosti bile 3,72, 4,12 i 3,84, redom. Signifikantnost koeficijenata regresionih modela ispitana je primenom Studentovog testa, a nakon isključivanja članova koji nisu bili statistički značajni, dobijeni su sledeći modeli:

$$Y_1(\%) = 26,17 - 3,17X_1 + 3,34X_2 + 0,45X_4 - 10,6X_5 + 0,737X_1^2 + 1,58X_2^2 - 1,47X_4^2 + 1,33X_1X_5 - 1,63X_2X_5 - 3,7X_5X_4 \quad (4.1.)$$

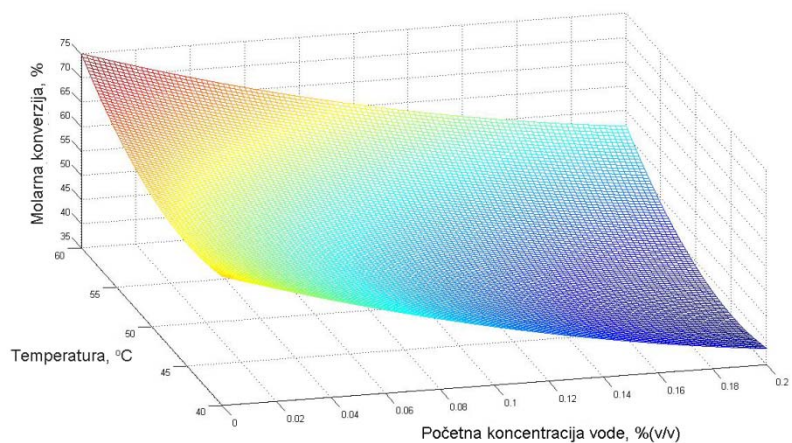
$$Y_2(mM) = 32,1 - 3,37X_1 + 3,47X_2 + 1,28X_2^2 - 2,39X_4^2 - 4,34X_5^2 - 4,19X_4X_5 \quad (4.2.)$$

$$Y_3(mm\text{ol } g^{-1}) = 5,42 - 0,632X_1 + 0,581X_2 - 2,26X_3 - 0,172X_4 + 0,008X_5 + 0,918X_3^2 - 0,465X_4^2 - 0,798X_5^2 + 0,317X_1X_3 - 0,773X_4X_5 \quad (4.3.)$$

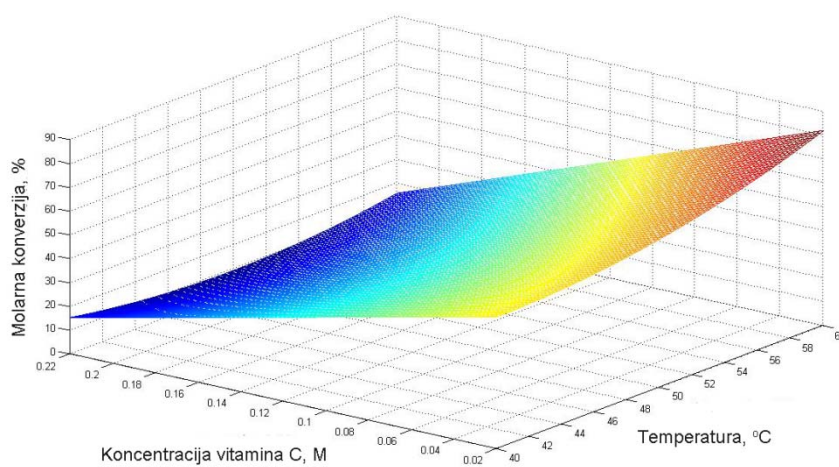
Analiziranjem prikazanih modela dolazi se do zaključka da ispitivani faktori imaju veoma različit efekat na ispitivane odzive. Tako se uočava da je svih 5 faktora pokazalo signifikantan uticaj na specifični prinos pri čemu je najintenzivniji uticaj koncentracije enzima (najveća vrednost koeficijenta), dok je iz modela za konverziju i koncentraciju estra taj član isključen. Takođe se može primetiti da su vrednosti koeficijenata koje ukazuju na intenzitet uticaja određenog faktora ili interakcije među njima veoma različite u sva tri modela.

4.3.2.1. Uticaj i optimizacija temperature

Kada je uticaj temperature na kojoj je izvođena esterifikacija ispitivan variranjem jednog po jednog parametra, maksimalni prinosi su postignuti na najvišoj ispitivanoj temperaturi – 55 °C. S obzirom na ovakav rezultat, za statistički planiran eksperiment odabran je opseg 40-60 °C. Iako je tačka ključanja acetona oko 56 °C, bilo je moguće izvoditi reakciju na temperaturi do 60 °C s obzirom na koligativne osobine rastvora pri čemu dolazi do povećanja temperature ključanja njenih komponenata. Dalje povećanje reakcione temperature dovelo bi do isparavanja rastvarača, tako da rad na višim temperaturama nije bio moguć.



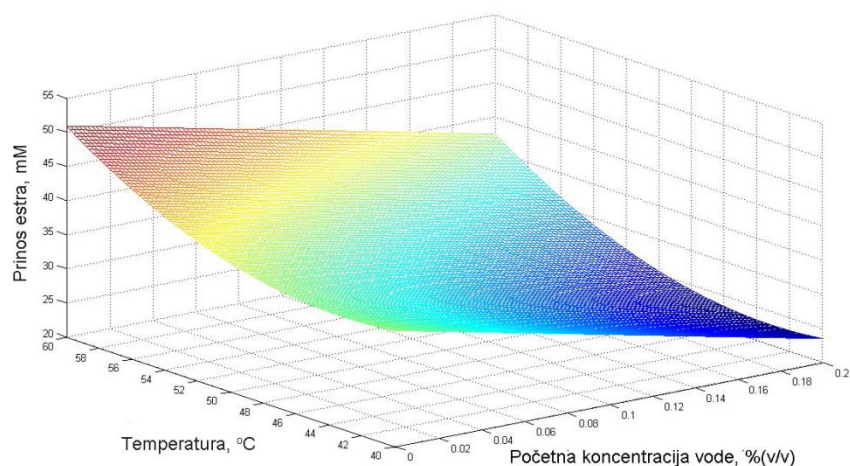
(a)



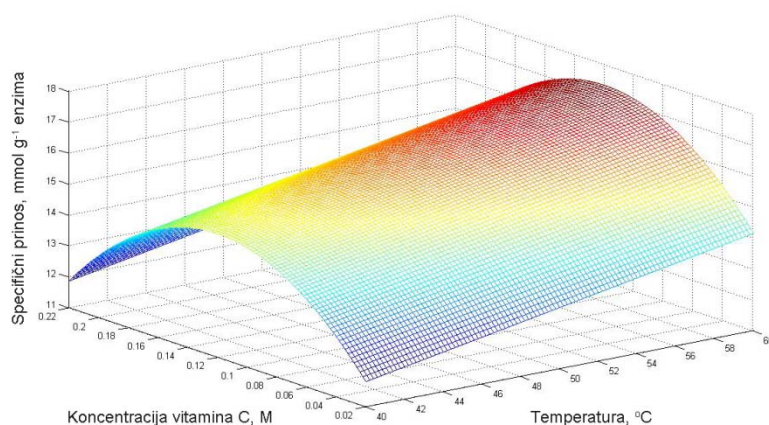
(b)

Slika 4.12. Odzivna površina efekta temperature i koncentracije vode (a) i temperature i koncentracije vitamina C (b) na molarnu konverziju.

Reakciona temperatura je parametar čija optimalna vrednost u najmanjoj meri zavisi od analiziranog odziva, što se ogleda u oblicima modela u kojima je uticaj ovog faktora u sve tri jednačine opisan pozitivnim linearnim članom, dok je u dve uključen i kvadratni član, takođe sa pozitivnim predznakom. Na slikama 4.12., 4.13. i 4.14. može se uočiti da su maksimalne vrednosti sve tri izlazne veličine postignute na najvišoj ispitivanoj temperaturi – 60 °C.



Slika 4.13. Odzivna površina uticaja temperature i koncentracije vode na prinos estra.

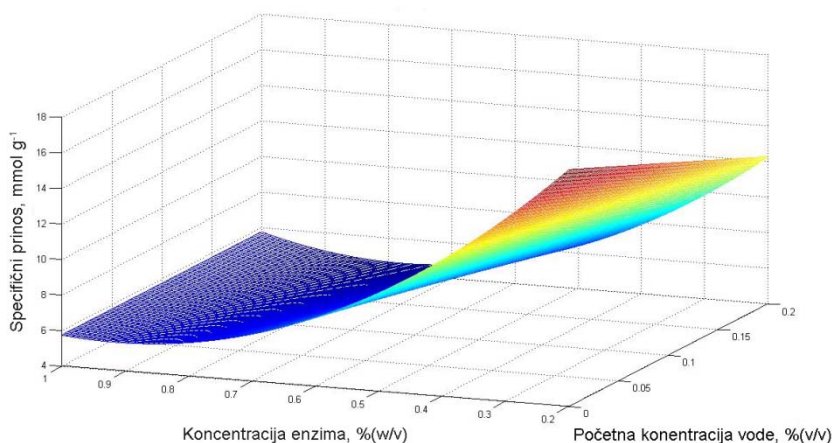


Slika 4.14. Odzivna površina uticaja temperature i koncentracije vitamina C na specifični prinos.

4.3.2.2. Uticaj i optimizacija koncentracije enzima

Na osnovu literaturnih podataka, kao i rezultata ostvarenih prilikom ispitivanja uticaja koncentracije enzima variranjem jednog po jednog parametra, sadržaj lipaze je u okviru statistički planiranog dela studije variran u opsegu od 0,2 do 1 %(w/v). Nakon statističke analize dobijenih rezultata, zaključeno je da koncentracija enzima u odabranom opsegu nema signifikantan uticaj na molarnu konverziju limitirajućeg supstrata i prinos askorbiloleata (jednačine 4.1. i 4.2.). Sa druge strane, sadržaj lipaze predstavlja veoma značajan faktor za specifičan prinos estra (jednačina 4.3.) čiji je uticaj opisan linearnim članom sa negativnim predznakom i pozitivnim kvadratnim članom. Maksimum funkcije ostvaruje se pri najnižoj vrednosti parametra – 0,2 %(w/v), što je i očekivano s obzirom na činjenicu da je u čitavom opsegu vrednost prinosa proizvoda gotovo konstantna (brojilac), dok imenilac koji predstavlja koncentraciju enzima sve vreme raste (slika 4.15.). Kada se

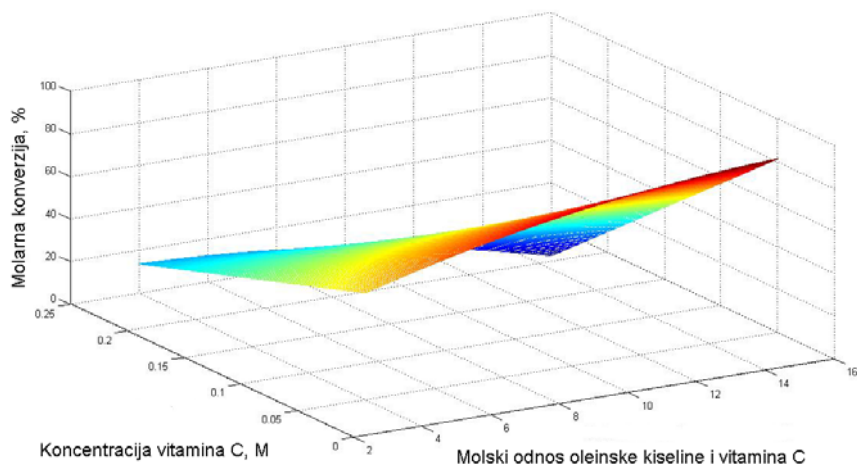
optimalna količina enzima utrošena u ovom eksperimentu upoređi sa studijama u kojima je korišćen isti komercijalni preparat – Novozym® 435, može se uočiti da je ona među najnižim prijavljenim vrednostima, s obzirom na to da su njihovi optimumi uglavnom bili u opsegu 0,18-1 %(w/v) (45, 48, 125, 126, 140, 141). Ovakav rezultat navodi na zaključak da u cilju postizanja visoke produktivnosti u procesima enzimske sinteze askorbil-estara masnih kiselina nije neophodno trošiti velike količine skupih enzimskih preparata.



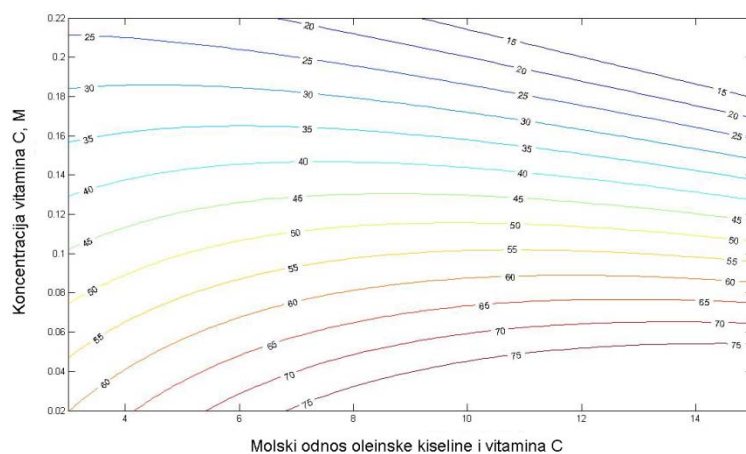
Slika 4.15. Odzivna površina uticaja koncentracije enzima i koncentracije vode na specifični prinos.

4.3.2.3. Uticaj i optimizacija koncentracije supstrata

Kada je uticaj koncentracije supstrata na stepen konverzije, koncentraciju proizvoda i specifični prinos estera ispitivan primenom RSM-a i CCRD-a, i to variranjem koncentracije vitamina C (faktor X_5) i molskog odnosa supstrata (X_4), utvrđeno je da su oba parametra signifikantna. Međutim, u sva tri modela su se vrednosti odgovarajućih koeficijenata razlikovale, pa su i rezultujući optimumi bili drugačiji što se može uočiti na slikama 4.16., 4.17. i 4.18.



(a)

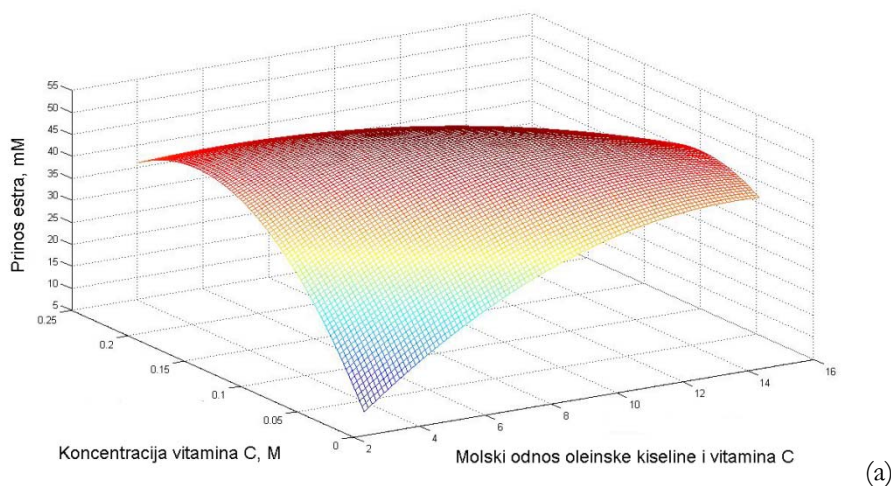


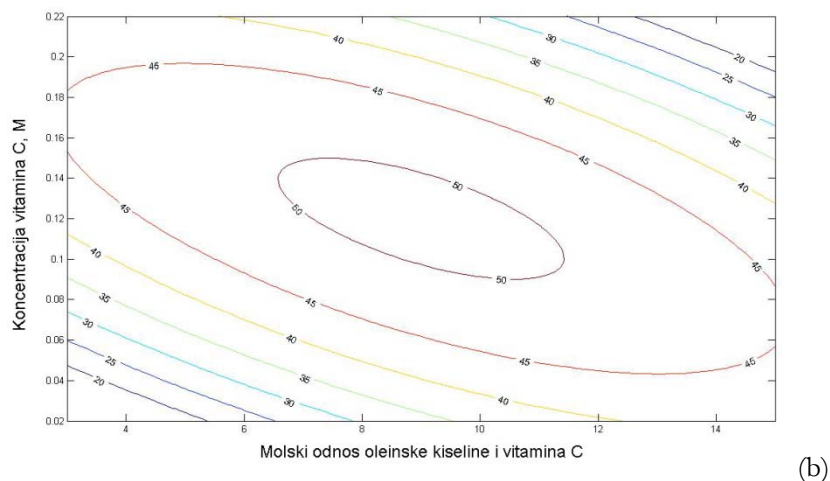
(b)

Slika 4.16. Odzivna površina (a) i kontrurni dijagram (b) uticaja koncentracije vitamina C i molskog odnosa supstrata na molarnu konverziju.

U slučaju konverzije kao odziva, uticaj koncentracije vitamina C je opisan samo linearnim članom sa negativnim predznakom, pa se maksimalne vrednosti konverzije postižu pri najnižoj vrednosti od 0,02 M L-askorbinske kiseline. Efekat molskog odnosa supstrata opisan je funkcijom sa maksimumom s obzirom na to da je opisan negativnim kvadratnim koeficijentom. Takođe, prisutna je i negativna interakcija između ova dva faktora. Tako se pri većim vrednostima koncentracije vitamina C, veće konverzije postižu pri najmanjim molskim odnosima supstrata, dok se za manje koncentracije limitirajućeg supstrata, optimum molskog odnosa pomera ka višim vrednostima. S obzirom na to da optimalnu vrednost molskog odnosa treba tražiti u oblasti niske koncentracije vitamina C, ustanovljeno je da se maksimalna molarna konverzija postiže pri odnosu 1:15. Sa druge strane, u jednačinama 4.2. i 4.3., signifikantni su i kvadratni članovi X_4^2 i X_5^2 , i to sa

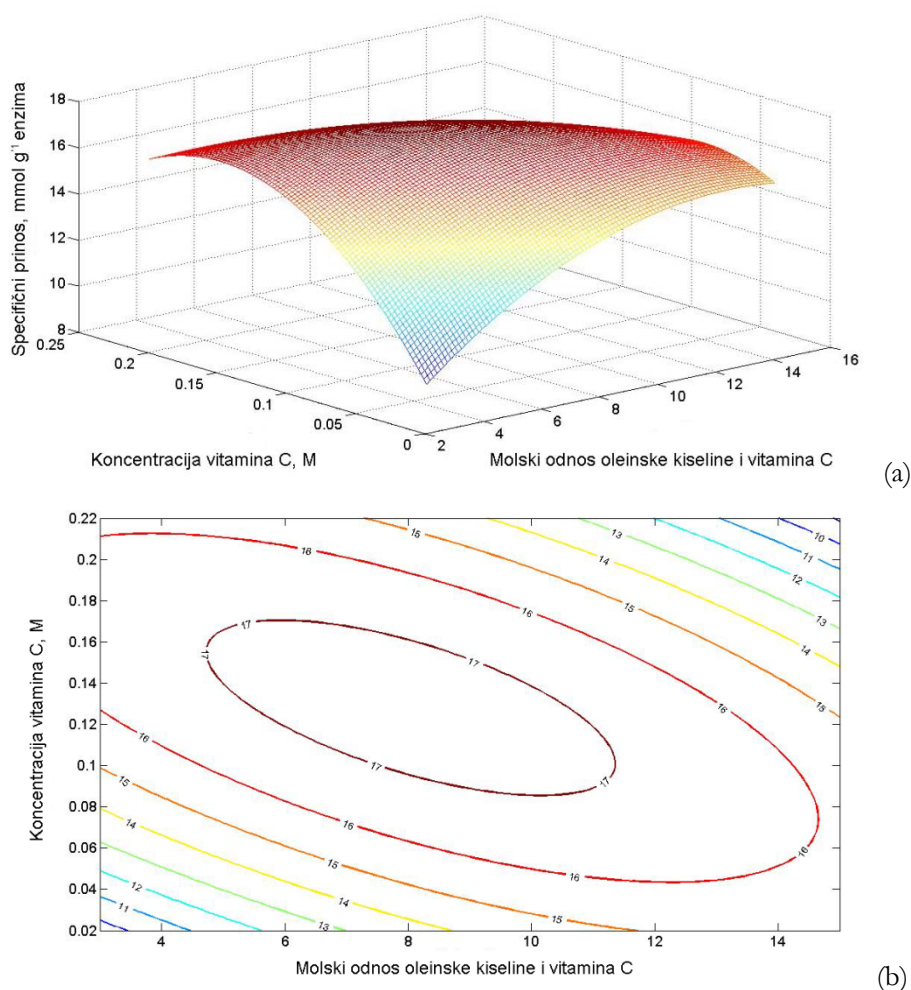
negativnim predznakom, pa funkcije poseduju maksimume u okviru ispitivanih opsega. Pored toga, u oba modela je prisutan i član koji predstavlja negativnu interakciju između koncentracije vitamina C i molskog odnosa supstrata koji dovodi do pomeranja lokalnih maksimuma. S obzirom na donekle različit intenzitet interakcije u dva modela, rezultujući optimumi se neznatno razlikuju. Maksimalna vrednost prinosa estra (Y_2) se tako postiže pri koncentraciji L-askorbinske kiseline od 0,13 M i molskom odnosu 1:9, dok model predviđa ostvarivanje najvećeg specifičnog prinosa proizvoda (Y_3) pri koncentraciji vitamina C od 0,135 M i molskom odnosu supstrata od 1:8. Očigledno je da su optimumi za ova dva odziva slični, ali da se značajno razlikuju od optimuma za molarnu konverziju. Evidentno je da se visok stepen konverzije vitamina C može ostvariti samo pri njegovim nižim koncentracijama (0,02 M), dok je sa aspekta ukupne produktivnosti procesa pogodno izvoditi sintezu pri 6,5 tj. 6,75 puta većoj koncentraciji limitirajućeg supstrata. Sa druge strane, optimumi molskog odnosa supstrata za prinos proizvoda i specifični prinos su niži nego za konverziju, što je uzrokovano negativnom interakcijom sa koncentracijom vitamina C. Ovakav trend pada prinosa askorbil-estara sa povećanjem koncentracije donora acil-ostatka iznad određene granice već je prijavljivan u literaturi i pripisivan konformacionim promenama molekula lipaze indukovanih prisustvom velikih količina lipofilne komponente u organskoj fazi koje otežavaju pristup hidrofilne L-askorbinske kiseline aktivnom centru enzima (127).





Slika 4.17. Odzivna površina (a) i konturni dijagram (b) uticaja koncentracije vitamina C i molskog odnosa supstrata na prinos estra.

U kontekstu literaturnih podataka, rezultati optimizacije koji ukazuju na pozitivan efekat dodavanja donora acil-ostatka u višku su očekivani. Što se tiče uticaja koncentracije limitirajućeg supstrata, u studijama u kojima je izlazna veličina bila konverzija primenjivane su niže koncentracije vitamina C (do 0,1 M) (46, 139, 140), dok je u slučajevima kada je praćen prinos estra, obično korišćena viša koncentracija L-askorbinske kiseline (48, 125, 138). Zapravo je u samo nekoliko istraživanja koncentracija limitirajućeg supstrata optimizovana sa aspekta koncentracije proizvoda (44, 131). U studiji posvećenoj optimizaciji enzimske sinteze L-askorbil-oleata pokazano je da pri nižim koncentracijama vitamina C sa povećanjem koncentracije dolazi do linearnog rasta prinosa pri različitim molskim odnosima, dok pri većim koncentracijama askorbinske kiseline i većim molskim odnosima supstrata dolazi do značajnog usporavanja rasta (44). U drugom istraživanju, autori su maksimalan prinos askorbil-estara konjugovane linolne kiseline dobili pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji vitamina C (0,28 M), ali treba imati u vidu da je upotrebljena visoka koncentracija enzima, pa su odgovarajući specifični prinosi niski (131).

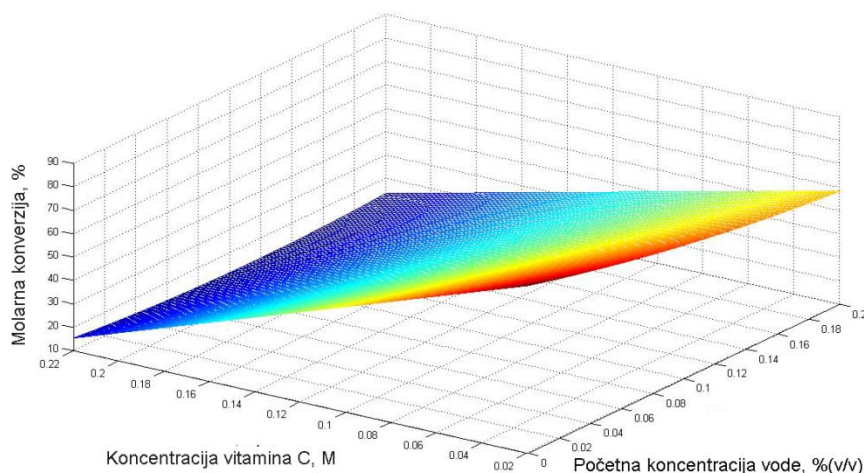


Slika 4.18. Odzivna površina (a) i konturni dijagram (b) uticaja koncentracije vitamina C i molskog odnosa supstrata na specifični prinos.

4.3.2.4. Uticaj i optimizacija početnog sadržaja vode

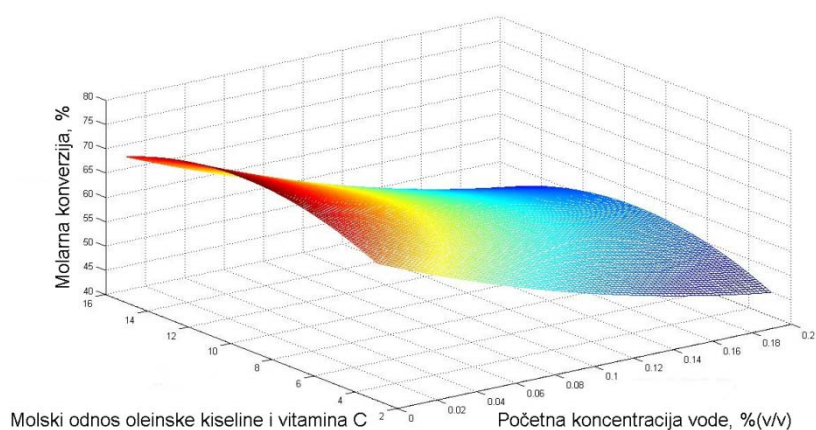
Značaj koncentracije vode pri izvođenju reakcija esterifikacije katalizovanih lipazama je dvojak. Ovaj parametar utiče na ravnotežnu koncentraciju proizvoda, s obzirom na to da kao proizvod esterifikacije favorizuje povratnu reakciju hidrolize. Sa druge strane, poznato je da je određena količina vode koja formira monomolekulski sloj oko molekula enzima neophodna da bi lipaze bile aktivne (137). U okviru optimizacije, početni sadržaj vode u reakcionoj smeši variran je u opsegu od 0,018 do 0,218 %(v/v). Kada se analiziraju sva tri dobijena modela, može se uočiti da je u svim slučajevima uticaj vode predstavljen samo linearnim članovima sa negativnim koeficijentom, što se ogleda u opadanju vrednosti sve tri izlazne veličine sa povećanjem početnog sadržaja vode (slike 4.13., 4.15., 4.19. i 4.20.) Kao optimalna se, stoga može smatrati najmanja početna koncentracija vode u sistemu od

0,018 %(v/v). U poređenju sa rezultatima u kojima je imobilisana CAL B korišćena kao biokatalizator u reakcijama sinteze estara, obično su najveći prinosi postizani kada je aktivnost vode u reakcionoj smeši bila veoma niska, pa čak i u anhidrovanim medijumima (218, 219). U studiji u kojoj su primenom RSM-a optimizovani uslovi za biosintezu L-askorbil-benzoata, maksimalna konverzija ostvarena je pri znatno višim koncentracijama vode nego u sličnim studijama, kao i u okviru ovog istraživanja (141).



Slika 4.19. Odzivna površina uticaja početne koncentracije vode i koncentracije vitamina C na molarnu konverziju.

Rezultat dobijen primenom RSM-a i CCRD-a se donekle razlikuje od optimuma dobijenog variranjem vode pri fiksiranim ostalim parametrima, kada je u odabranom opsegu (0,02-0,12 %(v/v)) ovaj parametar bio na granici signifikantnosti, ali su maksimalni prinos i početna brzina ostvareni sa 0,07 %(v/v) vode. Ono što nije bilo moguće utvrditi klasičnom metodom optimizacije, jesu interakcije vode kao parametra sa drugim ispitivanim faktorima. U modelu za stepen konverzije limitirajućeg supstrata (jednačina 4.1.) prisutan je član koji predstavlja pozitivnu interakciju između početnog sadržaja vode u reakcionom medijumu (X_1) i koncentracije vitamina C (X_5). S obzirom na to da je rastvorljivost L-askorbinske kiseline u vodi znatno veća nego u acetonu, može se pretpostaviti da oformljeni sloj vode, rastvarajući velike količine ovog supstrata, dovodi do povećanja koncentracije i raspoloživosti ovog supstrata u blizini aktivnog centra enzima. Takođe je u modelu za specifični prinos estera (jednačina 4.3.) prisutna pozitivna interakcija između koncentracije vode (X_1) i koncentracije enzima (X_3) koja se može pripisati neophodnosti prisustva količine vode dovoljne za formiranje monomolekulskog sloja u cilju očuvanja aktivne, otvorene konformacije molekula lipaze (225).



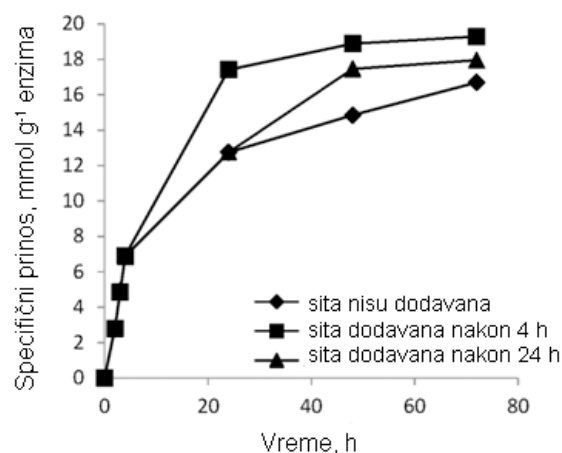
Slika 4.20. Odzivna površina uticaja početne koncentracije vode i molskog odnosa supstrata na molarnu konverziju.

4.3.2.5. Evaluacija modela

U cilju utvrđivanja mere u kojoj dobijeni modeli predviđaju tok reakcije u realnom sistemu, izvedena je reakcija pod uslovima prethodno optimizovanim za specifični prinos estra kao izlaznu veličinu. Pod ovim uslovima, za koje je prema modelu predviđen prinos od 17,2 mmol g⁻¹, proizvedeno je 16,7 mmol askorbil-oleata po gramu enzima, što predstavlja devijaciju od samo 2,9 %. Na osnovu ovog rezultata, može se zaključiti da se primena statističkog planiranja pri optimizaciji reakcionih parametara, pokazala opravdanom.

4.3.3. Uticaj dodavanja molekulskih sita

Kada se estri proizvode u reakciji između kiseline i alkohola katalizovanoj lipazama, kao sporedni proizvod nastaje voda, pa optimizacija početnog sadržaja vode nije dovoljna. S obzirom na to da koncentracija vode u sistemu u toku reakcije raste, ispitan je uticaj dodavanja molekulskih sita, s obzirom na to da se na taj način postiže kontinualno uklanjanje vode iz medijuma i pomeranje ravnoteže ka sintezi estra (53, 125). Međutim, u pojedinim istraživanjima je potvrđeno da, ukoliko se dodaju prerano, molekulska sita mogu dovesti do inaktivacije enzima jer narušavaju esencijani sloj vode oko molekula lipaze (226, 227). Stoga je uticaj molekulskih sita ispitan poređenjem specifičnog prinosa askorbil-oleata u sistemu bez sita, u reakciji u kojoj su sita dodata nakon 4 h, i u sistemu u koji su sita dodavana nakon 24 h.



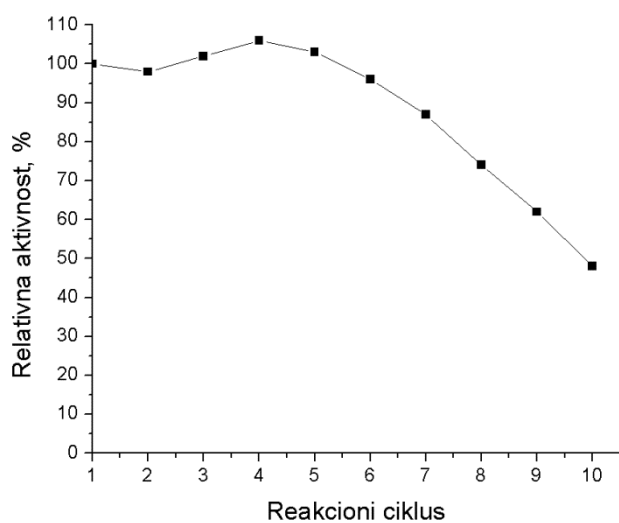
Slika 4.21. Uticaj dodavanja molekulkih sita. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 72 h na 60 °C, sa 0,135 M vitamina C, 1,08 M oleinske kiseline, 0,2 %(w/v) enzima i 0,018 %(v/v) vode, sa 50 mg mL⁻¹ molekulkih sita.

Sa slike 4.21. se može uočiti da je dodavanje adsorbensa u oba slučaja dovelo do povećanja prinosa, ali da je ovaj efekat znatno veći u slučaju dodavanja sita nakon 4 h. Na osnovu oblika krivih koje prikazuju rekcioni tok, očigledno je da u sistemu bez sita do najznačajnijeg pada brzine esterifikacije dolazi upravo oko četvrtog časa, pa je jasno da je efekat odvođenja suvišne vode iz sistema u ovom trenutku najveći. Kao rezultat toga, postiže se krajnji prinos od 19,3 mmol g⁻¹ nakon 72 h.

4.3.4. Operativna stabilnost i reaktivacija biokatalizatora

Upotrebom imobilisanog enzima u uzastopnim reakcionim ciklusima i praćenjem prinosa koji se pri tome postižu, dolazi se do informacija koje su veoma značajne za procenu mogućnosti ekonomične proizvodnje L-askorbil-oleata pod prethodno optimizovanim uslovima i daljeg razvoja postupka. Promena aktivnosti Novozym[®]-a 435 praćena je kroz 10 reakcionih ciklusa dužine 24 h, a odgovarajući relativni prinosi prikazani su na slici 4.22. Može se uočiti da esterifikaciona aktivnost u prvih 5 cikusa ostaje konstantna, pa čak dolazi i do neznatne aktivacije lipaze. Nakon toga, dolazi do gotovo linearnog pada aktivnosti enzima pa je zadržana aktivnost nakon desetog ciklusa oko 48 % od početne. U prethodnim studijama prijavljivane su različite stabilnosti lipaza korišćenih u sintezi, uglavnom alifatičnih estara (144, 154, 228, 229). Uopšteno, stabilnost lipaza značajno zavisi od prisustva hidrofilnih organskih supstanci, u vidu supstrata ili rastvarača, u reakcionom medijumu. Interesantan primer je istraživanje u kome je Lipozyme[®] izgubio najveći deo

svoje aktivnosti nakon 4 ciklusa kada je u *n*-heptanu sintetisan izoamil-acetat pri velikoj koncentraciji supstrata i ekvimolarnom odnosu, dok je isti enzim zadržao čak 90 % aktivnosti nakon 10 ciklusa kada je hidrofobniji supstrat (alkohol) korišćen u višku (228). Isti biokatalizator korišćen je na 40 °C u sintezi L-askorbil-laurata u smeši rastvarača čiji je log P bio -0,5 (aceton:dimetil sukfoksid = 2:8) pri čemu je nakon samo tri ciklusa u trajanju od 9,5 h izgubio 56,7 % početne aktivnosti (230). Novozym® 435 je u *n*-heptanu izgubio 30 % aktivnosti posle 5 ciklusa kada je korišćen u sintezi butil-izobutirata i 10 % nakon 3 ciklusa u reakciji dobijanja citronelol-laurata (144). Kada je askorbil-oleat sintetisan u istom rastvaraču kao u ovoj studiji korišćenjem Chirazyme®-a L-2 C2 kao biokatalizatora, metil-oleat je primenjen kao acil-donor u višku, i u takvom sistemu poluživot lipaze bio je 10 dana (139). Ovaj rezultat veoma je sličan rezultatu ostvarenom u okviru ove doktorske disertacije, ali se mora uzeti u obzir da su eksperimenti izvođeni pri veoma maloj koncentraciji vitamina C (0,03 M), 4,5 puta nižoj nego u eksperimentima izvedenim u okviru ove doktorske disertacije. Samim tim ukupna sintetisana količina askorbil-oleata od 153 mmol askorbil-oleata g⁻¹ enzima je znatno veća nego u pomenutoj studiji. Nešto bolji rezultati postizani su kada je sinteza estara izvođena u sistemima bez rastvarača (229), ali za sada nema studija u kojima su prijavljeni značajni rezultati pri sintezi askorbil-estara masnih kiselina u takvim medijumima. Takođe se pokazalo da primena jonskih tečnosti može obezbediti uslove u kojima u većem broju konsekvativnih reakcionih ciklusa neće doći do potpune inaktivacije imobilisanih lipaza, ali je u tom slučaju i cena rastvarača znatno viša (142).



Slika 4.22. Operativna stabilnost Novozym®-a 435. Reakcije su izvođene u acetonu u toku 24 h na 60 °C, 0,135 M vitamina C, 1,08 M oleinske kiseline, 0,2 %(w/v) enzima i 0,018 %(v/v) vode.

Nakon ispitivanja operativne stabilnosti lipaze, istražena je i mogućnost njene reaktivacije. Prethodno je objavljeno da se u sistemima koji sadrže organske rastvarače inaktivacija lipaza uglavnom događa zbog narušavanja njene trodimenzionalne strukture, dok na povišenim temperaturama može doći i do hemijskih modifikacija (101). Kao moguć način potpune ili delimične reaktivacije enzima nakon višekratne upotrebe, može biti primenjen tretman fosfatnim puferom sa ili bez prisustva deterdženata (101, 231). Pokazalo se da jednočasovna inkubacija inaktivirane lipaze u 50 mM fosfatnom puferu na sobnoj temperaturi dovodi do njene parcijalne reaktivacije, tako da je njena aktivnost nakon tretmana iznosila 72 % od početne. Ovakav rezultat ukazuje na mogućnost produžene upotrebe iste šarže enzima nakon inkubacije u fosfatnom puferu koja dovodi do smanjenja ukupnih troškova procesa.

4.4. Ispitivanje kinetike biosinteze L-askorbil-oleata

Da bi reakcije esterifikacije mogle biti izvođene u reaktorima većih dimenzija, a proces kontrolisan automatski, pored optimalnih uslova, neophodno je definisati i kinetički model koji adekvatno opisuje reakcioni tok. Poznavanje mehanizma po kome se odigrava reakcija daje mogućnost da se smanje ili eliminišu limitacije i ukazuje na potencijalno inhibitorno dejstvo neke od komponenata sistema. U ovom delu studije su stoga najpre definisani operativni uslovi pod kojima se postižu maksimalne početne brzine reakcije, a zatim pri takvim uslovima vršena kinetička ispitivanja. Uticaj 5 reakcionih faktora (temperature, koncentracije enzima, sadržaja vode, molskog odnosa supstrata i koncentracije vitamina C) u 5 nivoa vrednosti (tabela 4.3.) na ostvarene početne brzine esterifikacije ispitivan je primenom RSM-a i CCRD-a. Nakon toga je pod optimalnim uslovima izvedena kinetička studija, i to izvođenjem sinteze pri različitim koncentracijama oba supstrata. Koncentracije oleinske i L-askorbinske kiseline varirane su u veoma širokom opsegu (0,05-1 M) da bi se utvrdilo njihovo eventualno inhibitorno dejstvo. Kao rezultat, dobijen je kinetički model koji opisuje reakciju između vitamina C i oleinske kiseline u acetonu katalizovanu lipazom Novozym[®] 435, sa svim karakterističnim konstantama.

4.4.1. Uticaj reakcionih parametara na početnu brzinu esterifikacije

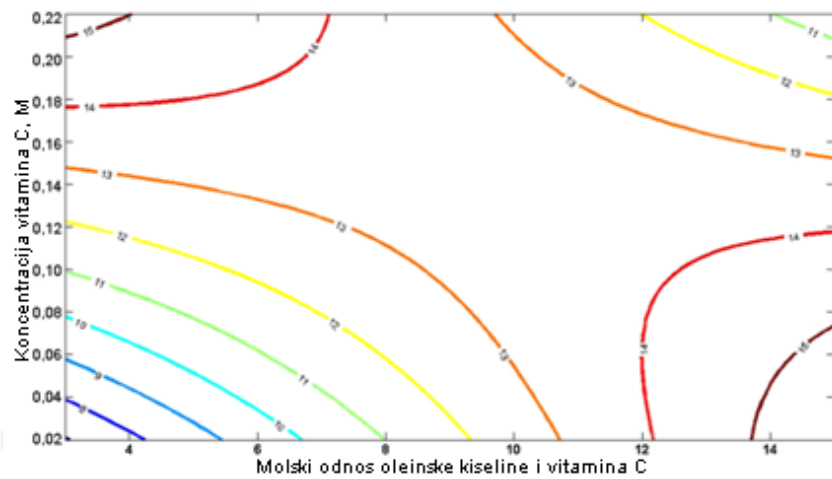
Da bi bili utvrđeni uslovi pod kojima se postižu maksimalne početne brzine reakcije esterifikacije vitamina C oleinskom kiselinom katalizovanom imobilisanom lipazom tipa B iz *C. antarctica*, primenjena je metoda odzivnih površina i centralni kompozitni rotabilni plan sa 5 faktora i 5 nivoa vrednosti koji uključuje 32 eksperimentalne tačke (tabela 4.5.). Zavisnost početne brzine reakcije od variranih parametara opisana je polinomom drugog stepena (jednačina 4.4.), a njegova adekvatnost ispitana je primenom Fišerovog testa. Izračunata *F*-vrednost iznosila je 2,89 ukazujući na to da dobijeni model odgovara eksperimentalnim rezultatima. Signifikantnost koeficijenata modela ispitivana je primenom Studentovog *t*-testa, pri čemu su svi insignifikantni članovi isključeni iz krajnje jednačine, izuzev članova $\beta_4 X_4$ i $\beta_{44} X_4^2$ koji su neophodni zbog hijerarhije modela, s obzirom na to da faktor X_4 (molski odnos supstrata) ima interakciju velikog intenziteta sa faktorima X_2 (temperatura) i X_5 (koncentracija vitamina C).

Tabela 4.5. Eksperimentalni plan sa stvarnim i kodiranim vrednostima reakcionih parametara i ostvarene početne brzine esterifikacije.

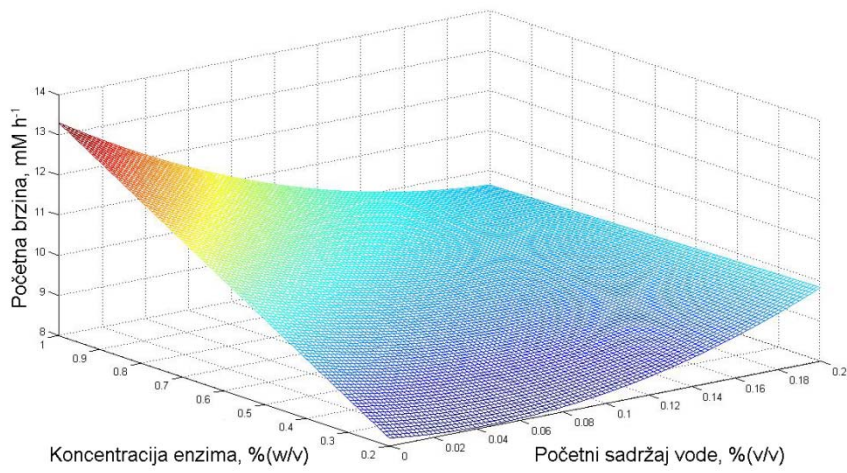
Eksp.	Početni sadržaj vode (%(v/v))	Temperatura (°C)	Koncentracija enzima (%(w/v))	Molski odnos supstrata	Koncentracija vitamina C (M)	Početna brzina reakcije (mM h ⁻¹)
1	0,168(1)	55(1)	0,8(1)	1:12(1)	0,17(1)	8,87
2	0,168(1)	55(1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,07(-1)	7,86
3	0,168(1)	55(1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,07(-1)	10,2
4	0,168(1)	55(1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,17(1)	10,4
5	0,168(1)	45(-1)	0,8(1)	1:12(1)	0,07(-1)	5,41
6	0,168(1)	45(-1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,17(1)	7,33
7	0,168(1)	45(-1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,17(1)	0,95
8	0,168(1)	45(-1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,07(-1)	3,94
9	0,068(-1)	55(1)	0,8(1)	1:12(1)	0,07(-1)	12,7
10	0,068(-1)	55(1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,17(1)	13,7
11	0,068(-1)	55(1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,17(1)	7,51
12	0,068(-1)	55(1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,07(-1)	6,75
13	0,068(-1)	45(-1)	0,8(1)	1:12(1)	0,17(1)	4,17
14	0,068(-1)	45(-1)	0,8(1)	1:6(-1)	0,07(-1)	6,02
15	0,068(-1)	45(-1)	0,4(-1)	1:12(1)	0,07(-1)	4,38
16	0,068(-1)	45(-1)	0,4(-1)	1:6(-1)	0,17(1)	5,04
17	0,218(2)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	3,75
18	0,018(-2)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	6,22
19	0,118(0)	60(2)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	14,2
20	0,118(0)	40(-2)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	5,49
21	0,118(0)	50(0)	1(2)	1:9(0)	0,12(0)	6,56
22	0,118(0)	50(0)	0,2(-2)	1:9(0)	0,12(0)	2,54
23	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:15(2)	0,12(0)	3,84
24	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:3(-2)	0,12(0)	2,15
25	0,188(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,22(2)	3,13
26	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,02(-2)	1,61
27*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	5,06
28*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	5,81
29*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	5,45
30*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	5,40
31*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	4,83
32*	0,118(0)	50(0)	0,6(0)	1:9(0)	0,12(0)	6,03

* - centralna tačka.

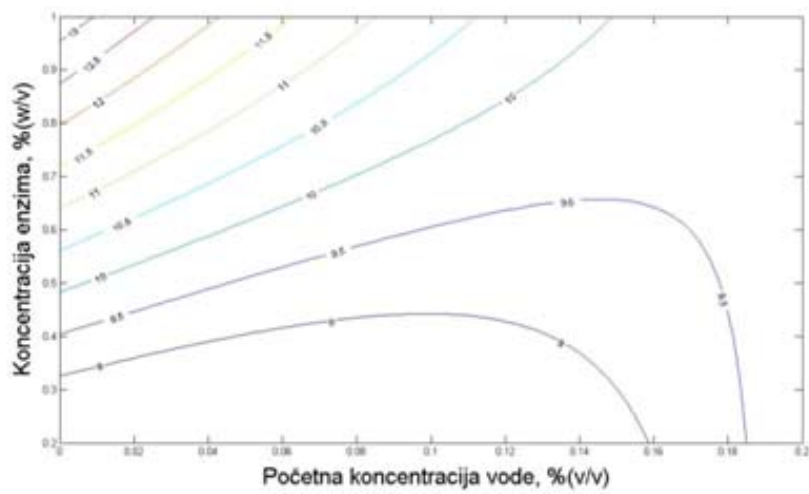
$$Y(\text{mM h}^{-1}) = 2,98 - 0,253X_1 + 1,43X_2 + 0,613X_3 - 0,0829X_4 + 0,19X_1^2 + 0,911X_2^2 - 0,096X_4^2 - 0,195X_5^2 - 0,331X_1X_3 + 0,297X_2X_4 + 0,191X_2X_5 - 0,854X_4X_5 \quad (4.4.)$$



Slika 4.23. Konturni dijagram uticaja molskog odnosa supstrata i koncentracije vitamina C na početnu brzinu esterifikacije.



(a)

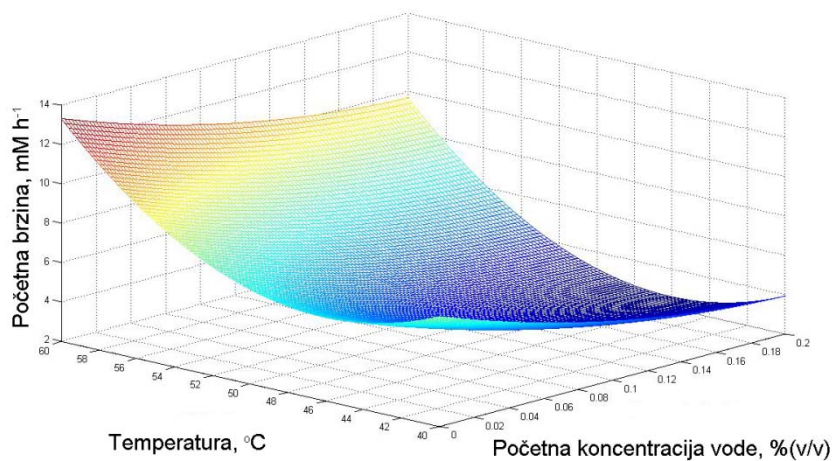


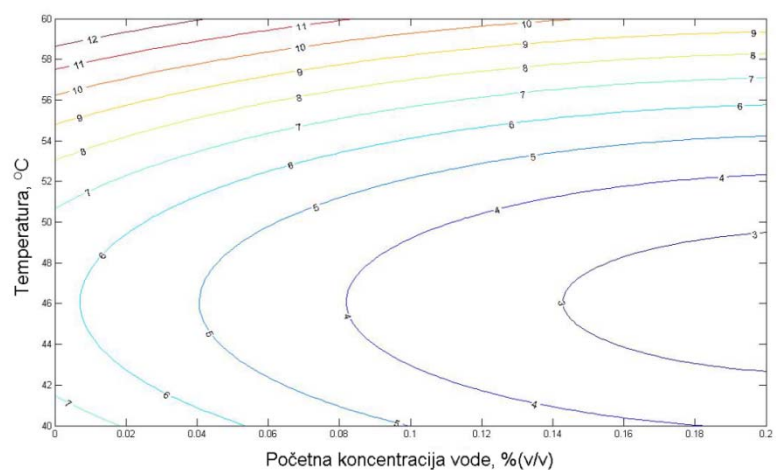
(b)

Slika 4.24. Odzivna površina (a) i konturni dijagram (b) uticaja koncentracije enzima i početnog sadržaja vode na početnu brzinu esterifikacije.

Finalni oblik modela predstavljen je jednačinom 4.4. iz koje se vidi da su pojedinačni uticaji svih 5 ispitivanih faktora uključeni, a da su prisutni i članovi koji opisuju pozitivnu interakciju temperature sa molaskim odnosom supstrata i koncentracijom L-askorbinske kiseline i negativnu interakciju između sadržaja vode i koncentracije enzima i molaskog odnosa supstrata i koncentracije vitamina C. Vrednosti koeficijenata koji opisuju prirodu i intenzitet navedenih interakcija pokazuju da je najznačajnija negativna interakcija između koncentracije vitamina C i molaskog odnosa supstrata ($\beta_{45} = -0,854$). Oba parametra su opisana kvadratnim funkcijama sa negativnim predznakom, pa poseduju maksimume. Usled pomenute interakcije, dolazi do pomeranja lokalnih maksimuma jednog faktora ka nižim vrednostima kada se povećava vrednost drugog (slika 4.23.). Kao posledica toga, velike vrednosti početnih brzina reakcije ostvarene su pri velikim molaskim odnosima supstrata i niskim koncentracijama vitamina C, i obratno. Verovatno je da pri niskim koncentracijama L-askorbinske kiseline veliki molaski odnos (veći od 1:15) obezbeđuje dovoljno visoke koncentracije donora acil-ostatka da bi se prvi korak formiranja acil-enzim kompleksa mogao odigravati većom brzinom. Sa druge strane, sa povećanjem koncentracije vitamina C, lokalni maksimumi se pomeraju ka znatno nižim molarnim odnosima, pa se najveće vrednosti početnih brzina postižu pri molaskim odnosima manjim od 1:3. Moguće je da pri velikim koncentracijama oleinske kiseline dolazi do pojave limitacija u prenosu mase, koja se često javlja u medijumima velike viskoznosti (232), kakva je reakciona smeša u slučaju kada oba faktora imaju visoke vrednosti, pa veliki deo zapremine sačinjava oleinska kiselina. Druga najintenzivnija interakcija je, prema modelu, negativna interakcija između početne koncentracije vode i sadržaja enzima (slika 4.24.). Uticaj količine biokatalizatora opisan je samo linearnim članom sa pozitivnim predznakom, pa je u celom ispitivanom opsegu sa porastom koncentracije lipaze rasla početna brzina esterifikacije. S obzirom na negativnu interakciju, pri nižim početnim sadržajima vode, uticaj koncentracije enzima na brzinu reakcije bio je značajan, dok je sa porastom količine vode u sistemu ovaj uticaj slabio, da bi pri koncentraciji vode od 0,2 % postao gotovo zanemarljiv. Očigledno je da nije potrebno dodavati vodu u reakcionu smešu da bi se postigle visoke vrednosti početnih brzina i da je količina vode inicijalno prisutne u rastvaraču dovoljna za očuvanje katalitičke aktivnosti enzima održavajući ga u otvorenoj konformaciji. Sa druge strane, suvišna količina vode dovodi do smanjivanja brzine esterifikacije, verovatno predstavljajući smetnju prenosu mase. Ispitano je i da li dalje smanjenje sadržaja vode dovodi do povećanja početnih brzina izvođenjem dodatnog

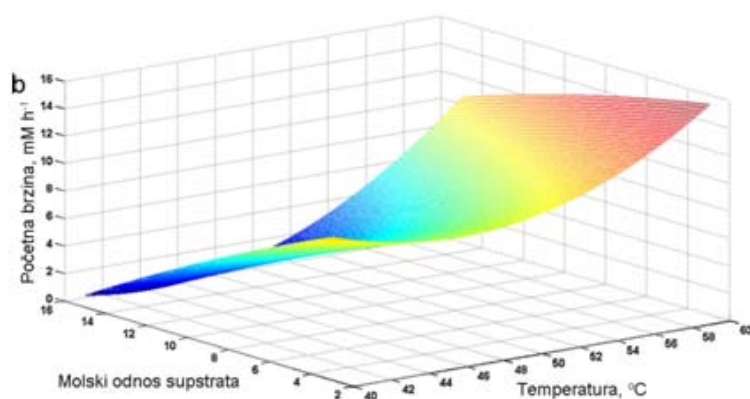
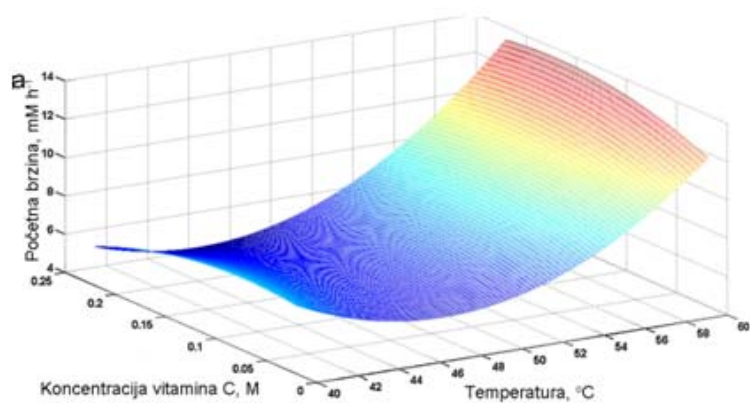
eksperimenta u kome je pod optimalnim uslovima izvedena reakcija u acetonu koji je prethodno dehidriran molekulskim sitima i acetonu koji nije bio izložen predtretmanu. Veća početna brzina ($15,8 \text{ mM h}^{-1}$) postignuta je u nedehidriranom acetonu u poređenju sa brzinom ostvarenom u bezvodnom acetonu ($14,2 \text{ mM h}^{-1}$), ukazujući na činjenicu da je mala količina vode u reakcionoj sredini potrebna da bi lipaza ispoljila svoju maksimalnu katalitičku aktivnost. Uticaj temperature predstavljen je na slici 4.25. sa koje se uočava da se maksimalne brzine reakcije postižu na najvećoj ispitivanoj temperaturi – $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Usled prisustva pozitivne interakcije između temperature i koncentracije vitamina C (slika 4.26.a), pri višim temperaturama dolazi do manjeg pomeranja lokalnih maksimuma od malih ka nešto većim koncentracijama L-askorbinske kiseline. Na niskim temperaturama su i difuzija u reakcionom medijumu i izmena supstrata na aktivnim centrima lipaze sporiji, pa je samim tim i visoka koncentracija vitamina C nepovoljna, dok se sa porastom temperature brzina odigravanja oba fenomena povećava, pa se veće početne brzine reakcije postižu kad su prisutne veće količine ovog supstrata. Sličan trend uočen je i kada je analizirana pozitivna interakcija temperature sa molskim odnosom supstrata (slika 4.26.b). Primetno je smanjenje negativnog uticaja povećanja molskog odnosa sa porastom temperature, verovatno zbog brže difuzije oba supstrata i smanjenja viskoziteta smeše kome u najvećoj meri doprinose velike koncentracije oleinske kiseline.





(b)

Slika 4.25. Odzivna površina (a) i konturni dijagram (b) uticaja temperature i početne koncentracije vode na početnu brzinu esterifikacije.

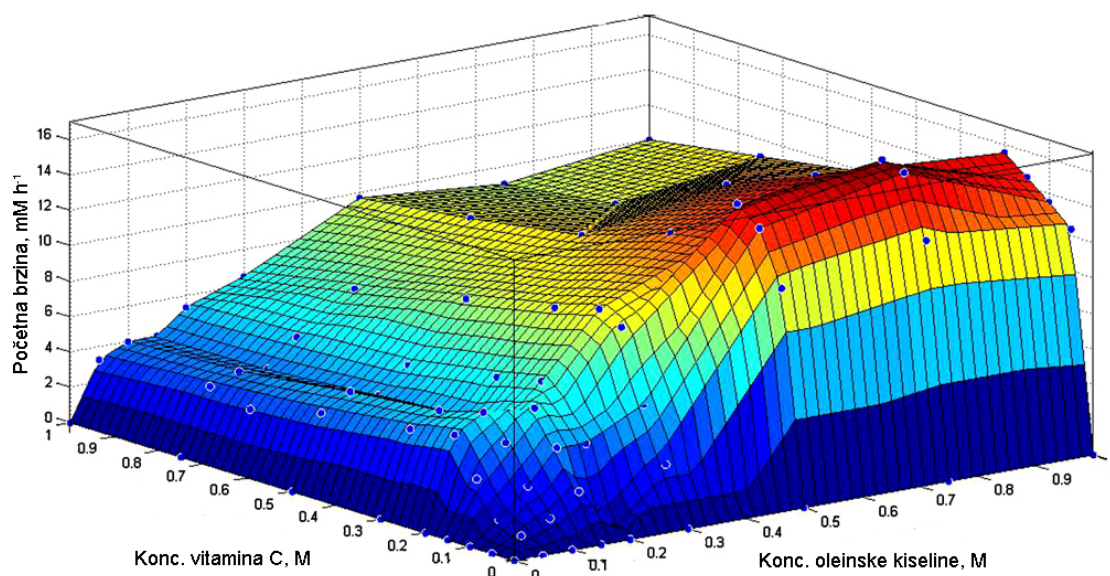


Slika 4.26. Odzivne površine uticaja temperature i koncentracije vitamina C (a) i temperature i molskog odnosa supstrata na početnu brzinu esterifikacije.

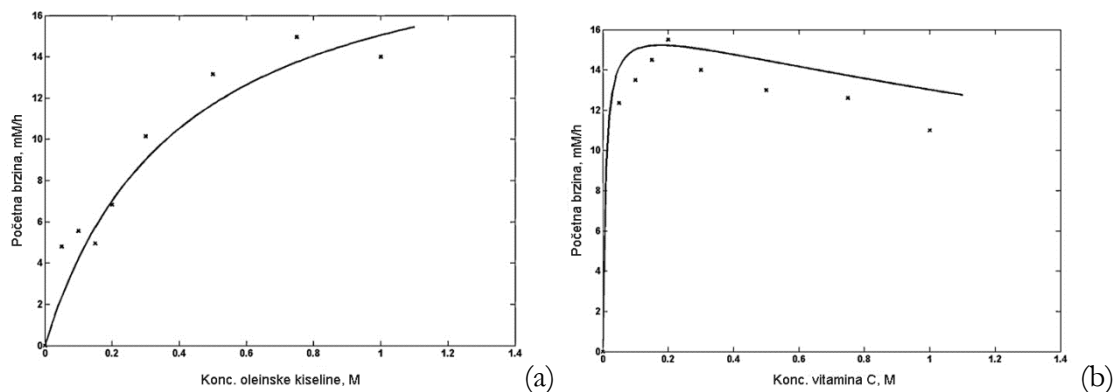
Mera u kojoj model predviđa uticaj 5 odabranih parametara na reakcione brzine ispitan je izvođenjem dodatnog eksperimenta na 60 °C, bez dodavanja vode, sa 1 %(w/v) enzima, 0,22 M vitamina C i molskom odnosu supstrata od 1:3. Ostvaren je rezultat od 15,6 mM h⁻¹ što predstavlja odstupanje od svega 3,2 % u odnosu na predviđenu vrednost. Optimalne vrednosti parametara (bez dodavanja vode, 60 °C i 1 %(w/v) lipaze) primenjivane su u daljim eksperimentima u kojima je ispitivana kinetika sinteze L-askorbil-oleata.

4.4.2. Analiza početnih brzina esterifikacije

U cilju dobijanja kinetičkog modela koji predstavlja korelaciju između početnih brzina i koncentracije oba supstrata – vitamina C i oleinske kiseline, reakcija je izvođena pri koncentracijama supstrata 0,05-1 M pri ostalim fiksiranim parametrima i analizirane su odgovarajuće početne brzine. Rezultati eksperimenata predstavljaju zajednički efekat koncentracije oba supstrata na početne brzine i prikazani su na slici 4.27. Među 64 izvedena eksperimenta, najveća početna brzina (16,7 mmol h⁻¹) ostvarena je pri visokoj koncentraciji oleinske kiseline (0,75 M) i značajno nižoj koncentraciji vitamina C (0,1 M).



Slika 4.27. Efekat koncentracije oba supstrata na početnu brzinu reakcije.

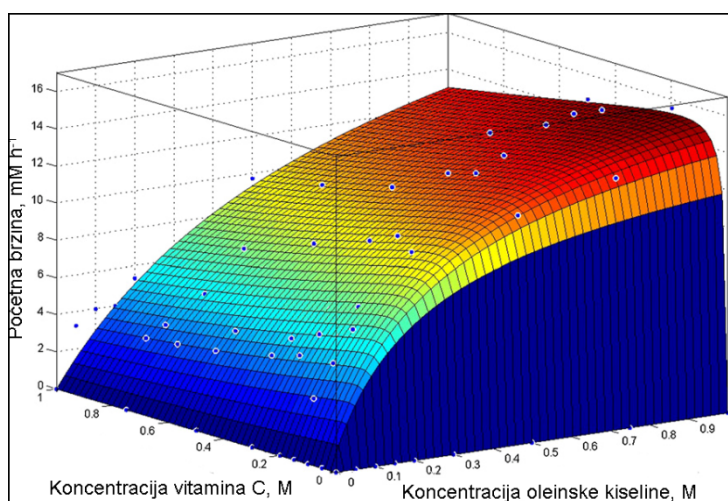


Slika 4.28. Tipične krive kinetičkog modela pri fiksiranoj koncentraciji jednog supstrata: (a) 0,3 M vitamina C i (b) 1 M oleinske kiseline.

Grafički prikaz rezultata pri fiksiranoj koncentraciji jednog supstrata dat je na slici 4.28. Može se uočiti da je uticaj koncentracije oleinske kiseline opisan tipičnom Mihaelis-Mentenovom krivom, dok se kod vitamina C uočava pad početnih brzina pri koncentracijama većim od 0,2 M što ukazuje na postojanje inhibicije visokim koncentracijama ovog supstrata. Eksperimentalni rezultati su stoga fitovani ping-pong bi-bi modelom sa inhibicijom acil-akceptorom (jednačina 4.5.):

$$v = \frac{V_{max}[A][K]}{K_m^K[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_{I,A}}\right) + \alpha K_m^A [K] + [A][K]} \quad (4.5.)$$

Adekvatnost modela je bila veoma dobra ($R^2=0,979$), što je i prikazano na slici 4.29., dok su izračunate kinetičke konstante predstavljene u tabeli 4.6. Visoka vrednost konstante inhibicije u poređenju sa rezultatima nekoliko ranijih istraživanja u kojima su rezultati fitovani sličnim kinetičkim modelima (154, 233) ukazuje na činjenicu da L-askorbinska kiselina nije jak inhibitor lipaze.

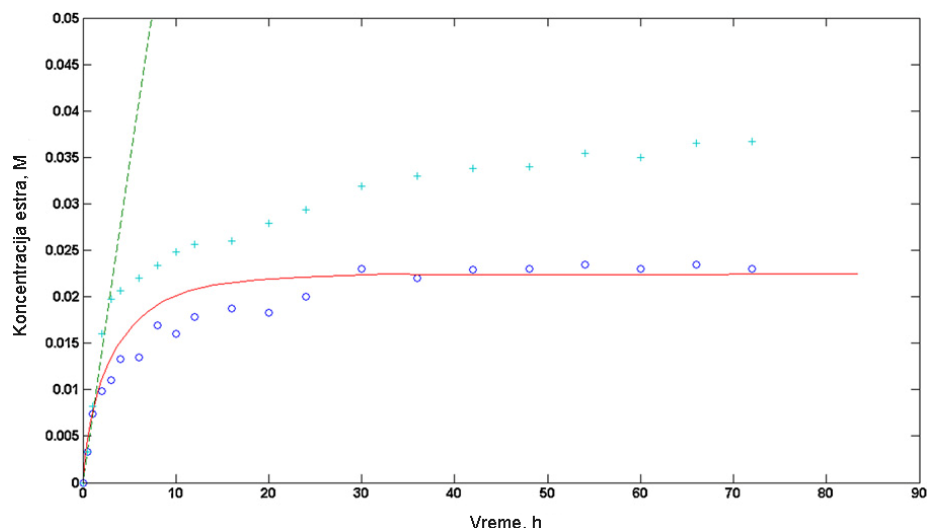


Slika 4.29. 3D prikaz ping-pong bi-bi modela sa inhibicijom L-askorbinskom kiselinom.

U studijama koje su do sada bile posvećene ispitivanju kinetike reakcija esterifikacije katalizovanih lipazom B iz *C. antarctica* predlagani su različiti mehanizmi odigravanja reakcije, sa ili bez inhibicije. Tako je sekvencijalni bi-bi model sa pravilnim redosledom vezivanja supstrata i inhibicijom kiselinom bio adekvatan pri opisivanju reakcije sinteze citronelol-laurata (144), dok je isti model koji uključuje kompetitivnu inhibiciju od strane oba supstrata i proizvoda predložen u sintezi izopropil-palmitata (234). Sa druge strane, za sintezu šećernih estara ustanovljen je ping-pong bi-bi mehanizam bez inhibicije (235). Ping-pong bi-bi model sa inhibicijom acil-akceptorom, kakav je predložen u ovoj studiji, prethodno je primenjen za opisivanje kinetike u reakcijama sinteze nekoliko estara: tetrahidrofurfuril-butirata u heptanu (158), butil-izobutirata u *n*-heksanu (154), L-askorbil-acetata u acetonu (160), itd. S obzirom na to da je kao najverovatniji prihvaćen mehanizam prema kome se kao prvi korak esterifikacija katalizovanih lipazama odigrava formiranje acil-enzim kompleksa, pretpostavlja se da je uzrok inhibicije izazvane alkoholom u višku formiranje neaktivnog (“dead end”) kompleksa između acil-akceptora i enzima. Razlike u prijavljenim modelima ukazuju na značajan uticaj prirode oba supstrata (veličina molekula, grananje, prisustvo hidroksilnih grupa u bočnom nizu) na mehanizam prema kome se reakcija odigrava. Ranije je prijavljeno da *C. antarctica* spada u grupu lipaza sa aktivnim centrom oblika levka zbog čega je njen afinitet prema kiselinama kraćeg i srednjeg lanca (do 14 C atoma) kao supstratima veliki, dok sa povećanjem dužine lanca opada (236). Iz tog razloga može se pretpostaviti da je pristup molekula vitamina C aktivnom centru lakši od sterno otežanog pristupa molekula oleinske kiseline, što rezultira češćim formiranjem neaktivnog kompleksa lipaze sa vitaminom C od aktivnog acil-enzim kompleksa. I razlika u konstantama specifičnosti između dva supstrata (oko 28 puta veća za vitamin C) ukazuje na veći afinitet lipaze prema L-askorbinskoj kiselini.

Tabela 4.6. Vrednosti kinetičkih konstanti modela.

Esterifikacija		Hidroliza	
Kinetička konstanta	Vrednost	Kinetička konstanta	Vrednost
$V_{m,es}$ (mmol h ⁻¹ dm ⁻³)	21,9	$V_{m,b}$ (mmol h ⁻¹ dm ⁻³)	16,9
K_{vc} (mol dm ⁻³)	0,0111	K_{ao} (mol dm ⁻³)	0,00963
K_{ok} (mol dm ⁻³)	0,309	$K_{s,ao}$ (dm ³ h ⁻¹ g ⁻¹)	0,175
$K_{i,vc}$ (mol dm ⁻³)	0,864		
$K_{s,vc}$ (dm ³ h ⁻¹ g ⁻¹)	0,197		
$K_{s,ok}$ (dm ³ h ⁻¹ g ⁻¹)	0,00709		



Slika 4.30. Fitovanje eksperimentalnih rezultata različitim modelima: eksperimentalni rezultati bez dodavanja molekularskih sita (krugovi) i sa molekularskim sitima (krstići), simulacija ping-pong bi-bi modela sa inhibicijom vitaminom C bez uključene reakcije hidrolize (isprekidana linija) i sa uključenom reakcijom hidrolize (puna linija).

U cilju razvoja enzimskih procesa i reaktora u komercijalne svrhe neophodno je razviti takav kinetički model koji dobro opisuje promenu koncentracije proizvoda u toku celog reakcionog vremena. Iz tog razloga je model dobijen u prethodnom delu istraživanja, baziran na početnim brzinama, proširen uključivanjem uticaja povratne reakcije hidrolize. Tipični eksperimentalni rezultati dobijeni pri 0,1 M vitamina C i 0,5 M oleinske kiseline fitovani su sa oba modela (slika 4.30). Uočava se da se simulacijom modela bez uključene hidrolize (isprekidana linija) dobro fituju eksperimentalni podaci samo u prvih 90 min reakcije. Velike razlike između eksperimentalnih rezultata i predviđanja modela se mogu pripisati intenziviranju hidrolize formiranog estra sa napredovanjem reakcije. U cilju provere ove hipoteze, izveden je dodatni eksperiment dodavanjem molekularskih sita nakon 2 h s obzirom na to da koncentracija vode u reakcionom medijumu utiče na brzinu hidrolize (46). Sa slike se može uočiti da se dodavanjem molekularskih sita produžava linearni rast koncentracije estra za nekoliko sati (krstići) ukazujući na to da se pojava hidrolize proizvoda odlaže odvođenjem formirane vode, ali da kada se jednom prevaziđe kapacitet adsorbensa do hidrolize dolazi. Kada se reakcija hidrolize, prema literaturi opisana Mihaelis-Mentenovom jednačinom (237), uključi u kinetički model, dobijaju se sledeći izrazi:

$$v = \frac{d[AO]}{dt} = v_e - v_h$$

$$v_h = \frac{V_{m,h}[AO]}{K_{AO} + [AO]} = v - v_e$$

u kojima je $[AO]$ koncentracija askorbil-oleata, v_e brzina esterifikacije, v_h brzina hidrolize i v brzina reakcije. Iz ovih jednačina se dobijaju kinetičke konstante $V_{m,h}$ - maksimalna vrednost početne brzine hidrolize i K_{AO} - Mihaelisova konstanta za askorbil-oleat. Vrednosti konstanti prikazane su u tabeli 4.6., dok je simulacija modela predstavljena punom linijom na slici 4.30. Ostvareno je dobro poklapanje predviđanja modela sa eksperimentalnim rezultatima ($R^2=0,943$) što pokazuje da se model dobijen u prvom delu kinetičke studije sa uključenim uticajem povratne reakcije hidrolize može uspešno primenjivati u praćenju i predviđanju toka reakcije. Takođe se na osnovu vrednosti konstante specifičnosti lipaze prema askorbil-oleatu (oko 25 puta veća nego prema oleinskoj kiselini) može zaključiti da je visoke prinose proizvoda, pored odvođenja vode, moguće dobiti i odvođenjem glavnog proizvoda iz reakcione smeše.

4.5. Imobilizacija lipaze tipa B iz *C. antarctica*

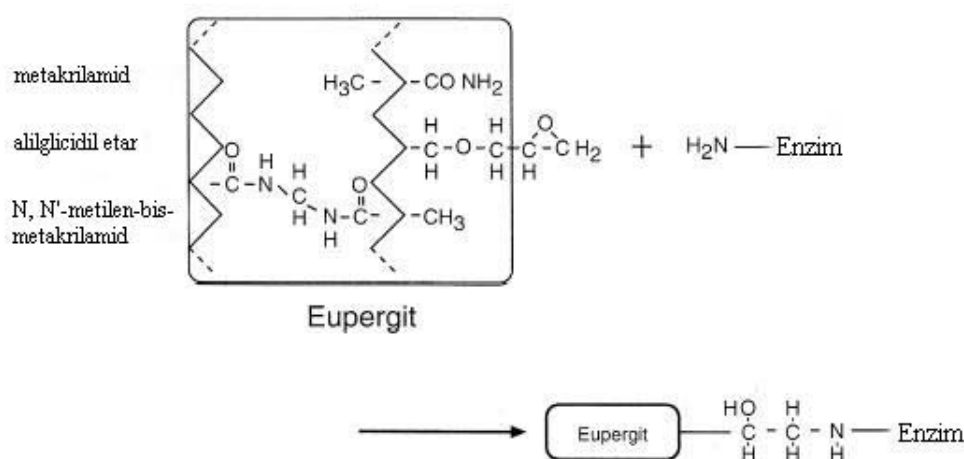
S obzirom na visoku cenu komercijalnog enzimskog preparata korišćenog u okviru ovog istraživanja kao i ograničen broj potencijalnih biokatalizatora u reakcijama sinteze askorbil-estara masnih kiselina, neophodan je rad na razvijanju pogodnih tehnika imobilizacije u cilju dobijanja što efikasnijih i jeftinijih katalizatora. Treba imati u vidu i mogućnost fizičke desorpcije i “curenja” lipaze sa Novozym[®]-a 435 u toku korišćenja, koja je i potvrđena u dostupnoj literaturi (66). U okviru pomenutog istraživanja, takođe je ustanovljeno da se u organskim rastvaračima i jonskim tečnostima odigrava degradiranje samog nosača pri čemu se oslobađa veliki broj jedinjenja, od kojih su pojedina i reaktivna u prisustvu CAL B (glicerol, benzoeva kiselina, 2-hidroksi-etil-benzoat, 2-hidroksi-etil-sorbat i sorbinska kiselina). Poslednja četiri nabrojana jedinjenja mogu biti donori acil-ostatka u enzimskim esterifikacijama i transesterifikacijama.

U okviru ove doktorske disertacije, CAL B proizvedena od strane genetski modifikovane plesni *Aspergillus niger* imobilisana je na različite nosače primenom više tehnika. Izbor nosača je izveden tako da omogući da se ispita uticaj što većeg broja faktora na efikasnost imobilizacije: vrste vezivanja (imobilizacija adsorpcijom i kovalentna imobilizacija enzima), funkcionalne grupe na nosaču (amino, epoksi, hloridne), dimenzija i poroznosti nosača (nanočestice i makroporozni nosači) i afiniteta nosača prema vodi (hidrofilni i hidrofobni nosači). Svi imobilizati karakterisani su i optimizovani sa aspekta svoje hidrolitičke aktivnosti, a zatim testirani kao potencijalni katalizatori za sintezu estara L-askorbinske kiseline. Primenjene su tehnike adsorpcije na hidrofobne polistirenske nosače, zatim kovalentno vezivanje na nosače sa epoksidnim grupama, imobilizacija na “pametni” polimer Eudragit[®] S-100 koji poseduje osobinu reverzne rastvorljivosti u zavisnosti od pH sredine, kao i vezivanje za silikatne materijale u vidu nano čestica sa uvedenim različitim funkcionalnim grupama. Svaki od primenjenih nosača i tehnika imobilizacije biće detaljnije opisan u nastavku.

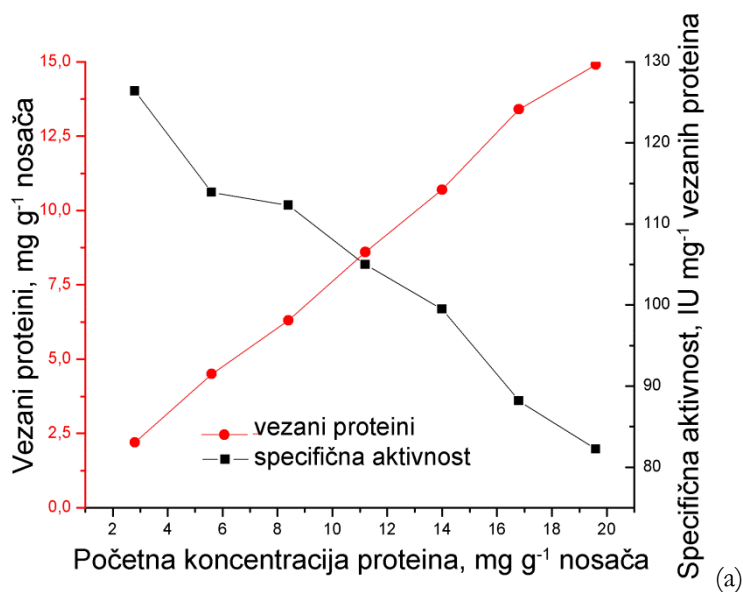
4.5.1. Imobilizacija CAL B na Eupergit[®] C250L

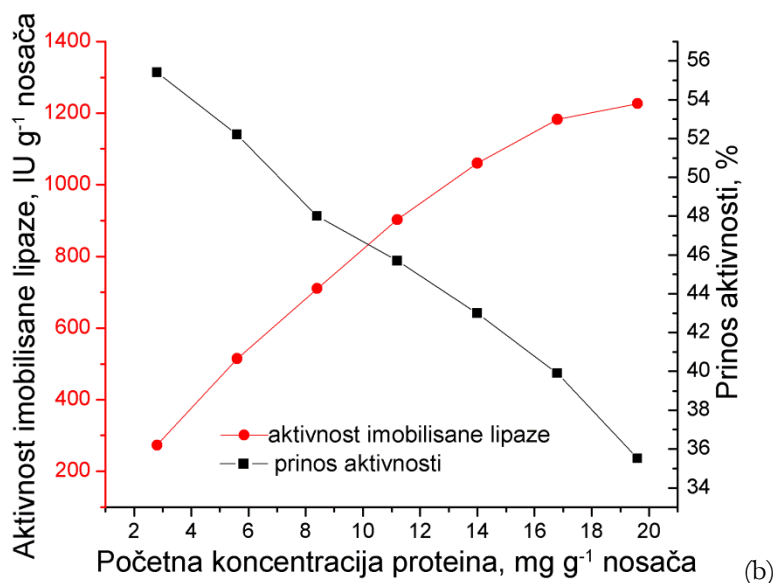
Eupergit[®] predstavlja kopolimer *N,N*-metilen-bis-metakrilamida, metakrilamida i monomera sa oksiranskim grupama (slika 4.31.). Zahvaljujući svojoj strukturi, poseduje veliku hemijsku i mehaničku stabilnost, a ne podleže bubrenju i skupljanju u širokom opsegu pH vrednosti (238). Smatra se kompatibilnim sa uobičajenim konfiguracijama

reaktorskih sistema, od šaržnih reaktora sa mešanjem, do protočnih reaktora sa pakovanim slojem. Eupergit[®] C250L, koji je korišćen pri izradi ove doktorske disertacije, po fizičkim karakteristikama predstavlja porozne sfere prosečnog prečnika 0,25 mm i poluprečnika pora 100 nm na čijoj se površini nalazi više od 200 μmol epoksidnih grupa po gramu. Upravo posredstvom ovih grupa, odigrava se reakcija kovalentnog vezivanja enzima i to uglavnom preko amino-grupa na površini molekula proteina (slika 4.31.). Veza se može uspostaviti i sa sulfhidrilnim i karboksilnim grupama molekula enzima.



Slika 4.31. Struktura Eupergit[®]-a (16).





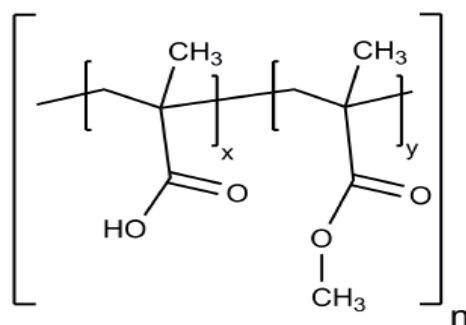
Slika 4.32. Uticaj početne koncentracije proteina u rastvoru za imobilizaciju na: (a) masu vezanih proteina i specifičnu aktivnost imobilisane lipaze i (b) aktivnost imobilisane lipaze i prinos aktivnosti.

Standardna procedura po kojoj se različiti enzimi mogu imobilisati na Eupergit[®], kako u laboratorijskim tako i u industrijskim razmerama, podrazumeva inkubaciju u puferu u toku 12-70 h na sobnoj temperaturi ili na 4 °C (239). S obzirom na to da je imobilizacija lipaza na Eupergit[®] dobro opisana u literaturi (238-242), uslovi pod kojima je vršeno vezivanje bili su konstantni (1 M pufer, pH 7, 25 °C). S obzirom na to da je u eksperimentima korišćen nosač sa manjom koncentracijom epoksidnih grupa (Eupergit[®] C - 600 μmol g⁻¹, Eupergit[®] C250L - 200 μmol g⁻¹), i da je očekivano da je za vezivanje iste mase proteina neophodna veća masa nosača, korišćeno je 50 mg nosača po mililitru smeše pufera i lipaze. Količina ponuđenih proteina za imobilizaciju varirana je u opsegu 2,8-19,6 mg g⁻¹ nosača, a rezultati predstavljeni na slici 4.32. U okviru ispitivanih vrednosti, količina vezanih proteina kontinualno raste sa porastom koncentracije enzima (slika 4.32.a), dok je odgovarajući stepen imobilizacije gotovo konstantan i kreće se između 75 i 80 %. U isto vreme, uticaj povećanja količine lipaze na prinos aktivnosti je suprotan i dovodi do pada od 55,4 do 35,5 % (slika 4.32.b). Iako su aktivnosti imobilisanog enzima rasle sa povećanjem početne koncentracije lipaze (slika 4.32.b), uočava se da su odgovarajuće vrednosti specifičnih aktivnosti lipaze (IU mg⁻¹ vezanih proteina) u isto vreme opadale (slika 4.32.a). Kada se uzme u obzir da je pad specifične aktivnosti od 35 % u čitavom ispitivanom opsegu praćen povećanjem aktivnosti po masi imobilizata od oko 4,5 puta, jasno je da je rad sa većim

količinama lipaze, i pored manjeg prinosa, opravdan. U skladu sa tim, za ispitivanje esterifikacione aktivnosti u reakciji sinteze askorbil-oleata upotrebljen je enzim dobijen pri koncentraciji ponuđenih proteina od 19,6 mg g⁻¹ nosača čija je hidrolitička aktivnost iznosila 1228,6 IU g⁻¹ Eupergit[®]-a C250L.

4.5.2. Imobilizacija CAL B na Eudragit[®] S-100

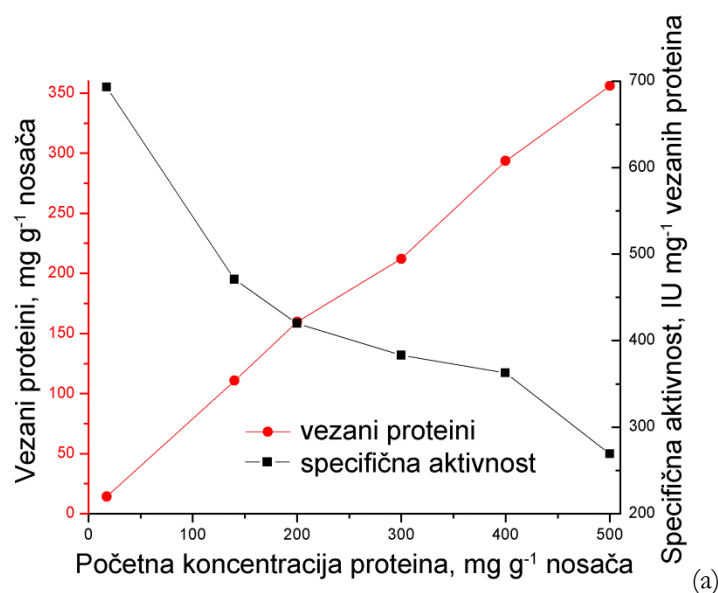
Eudragit[®] S-100 je anjonski kopolimer metakrilne kiseline i metil-metakrilata (odnos 1:2) čija je struktura prikazana na slici 4.3. Po svojim fizičkim svojstvima predstavlja belu praškastu supstancu karakterističnog mirisa koja poseduje osobinu reverzibilne rastvorljivosti. U rastvorima čije su pH vrednosti iznad 7 nalazi se u rastvorenom obliku, dok pri pH vrednostima ispod 4 u potpunosti prelazi u talog. Pored toga, Eudragit[®] S-100 može biti reverzibilno istaložen na temperaturi od 40 °C u prisustvu Ca²⁺ jona u koncentraciji od 100 mM. Njegova primarna namena je u farmaceutskoj industriji, za formulacije lekova sa kontrolisanim ispuštanjem aktivnih supstanci čije je ciljano mesto delovanja u debelom crevu. Takođe se, u kombinaciji sa drugim “pametnim polimerima” može koristiti za omogućavanje dostavljanja leka u druge delove gastrointestinalnog trakta. Osobina reverzne rastvorljivosti Eudragit[®] S-100 čini atraktivnim i za primenu u separaciji proteina i imobilizaciji enzima. Njegova prednost pri korišćenju za imobilizaciju enzima u odnosu na klasične čvrste nosače jeste što su difuzione limitacije i sterne smetnje znatno umanjene, pa je pristup supstrata aktivnom centru enzima neometan. U poređenju sa slobodnim enzimima, pogodnost je to što se nakon završetka reakcije enzim može lako izdvojiti taloženjem i ponovo koristiti, a proizvod se na taj način prečišćava od proteina.

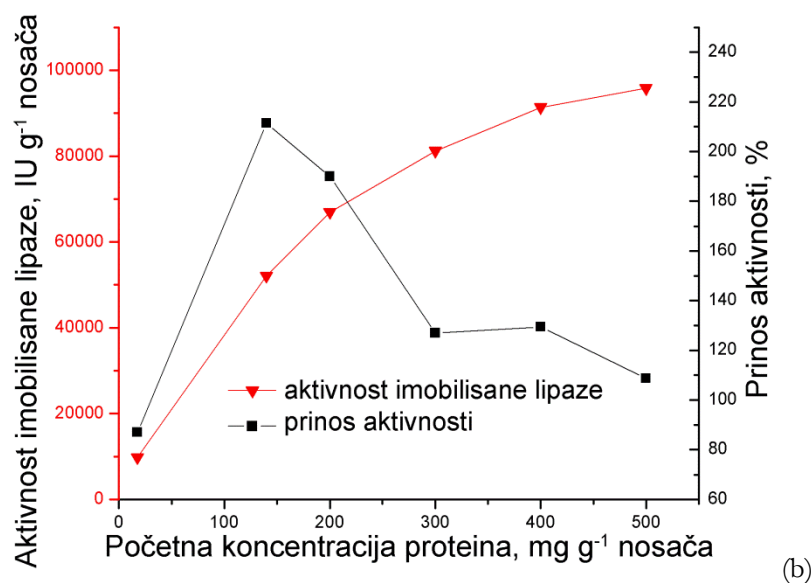


Slika 4.33. Struktura Eudragit[®]-a.

Kada su optimizovani uslovi imobilizacije CAL B na Eudragit[®] S-100, osnovna varirana veličina bila je masa unetih proteina po gramu polimera. Zbog specifičnosti nosača, ostali

uslovi imobilizacije su bili konstantni (pH, vreme). Opseg u kome je ispitivan uticaj ponuđene količine proteina na njihovo vezivanje za polimer i aktivnost dobijenog imobilisanog preparata bio je veoma širok – 17,5 do 500 mg g⁻¹ nosača. U čitavom opsegu je primetan porast količine vezanih proteina sa povećanjem ponuđene koncentracije proteina za imobilizaciju (slika 4.34.a). Pokazalo se da je kapacitet Eudragit[®]-a S-100 za vezivanje proteina izuzetno veliki pa je maksimalna vezana masa iznosila 356 mg g⁻¹ nosača. Istovremeno je sa povećanjem koncentracije lipaze primećen blag pad stepena imobilizacije od 80 do 70 %. Vezivanje proteina za nosač praćeno je i povećanjem aktivnosti imobilizata, koja dostiže gotovo sto puta veće vrednosti od onih ostvarenih sa čvrstim nosačima (slika 4.34.b). Primećena je i aktivacija nosača, pa se tako pri ponuđenoj koncentraciji proteina od 140 mg g⁻¹ nosača ostvaruje prinos aktivnosti od 211,5 %. Povećanje količine vezanih proteina je praćeno takvim povećanjem aktivnosti koje rezultira opadanjem specifične aktivnosti sa 692,8 na 269,2 IU mg⁻¹ vezanih proteina (slika 4.34.a). Dodatnim eksperimentom u kome je imobilisana CAL B tretirana 1 % Triton[®]-om X-100 potvrđeno je da je najveći deo interakcija lipaze sa nosačem hidrofobne prirode, s obzirom na to da je na ovaj način desorbovano čak 82,9 % vezanih proteina.





Slika 4.34. Uticaj početne koncentracije proteina u rastvoru za imobilizaciju na: (a) masu vezanih proteina i specifičnu aktivnost imobilisane lipaze i (b) aktivnost imobilisane lipaze i prinos aktivnosti.

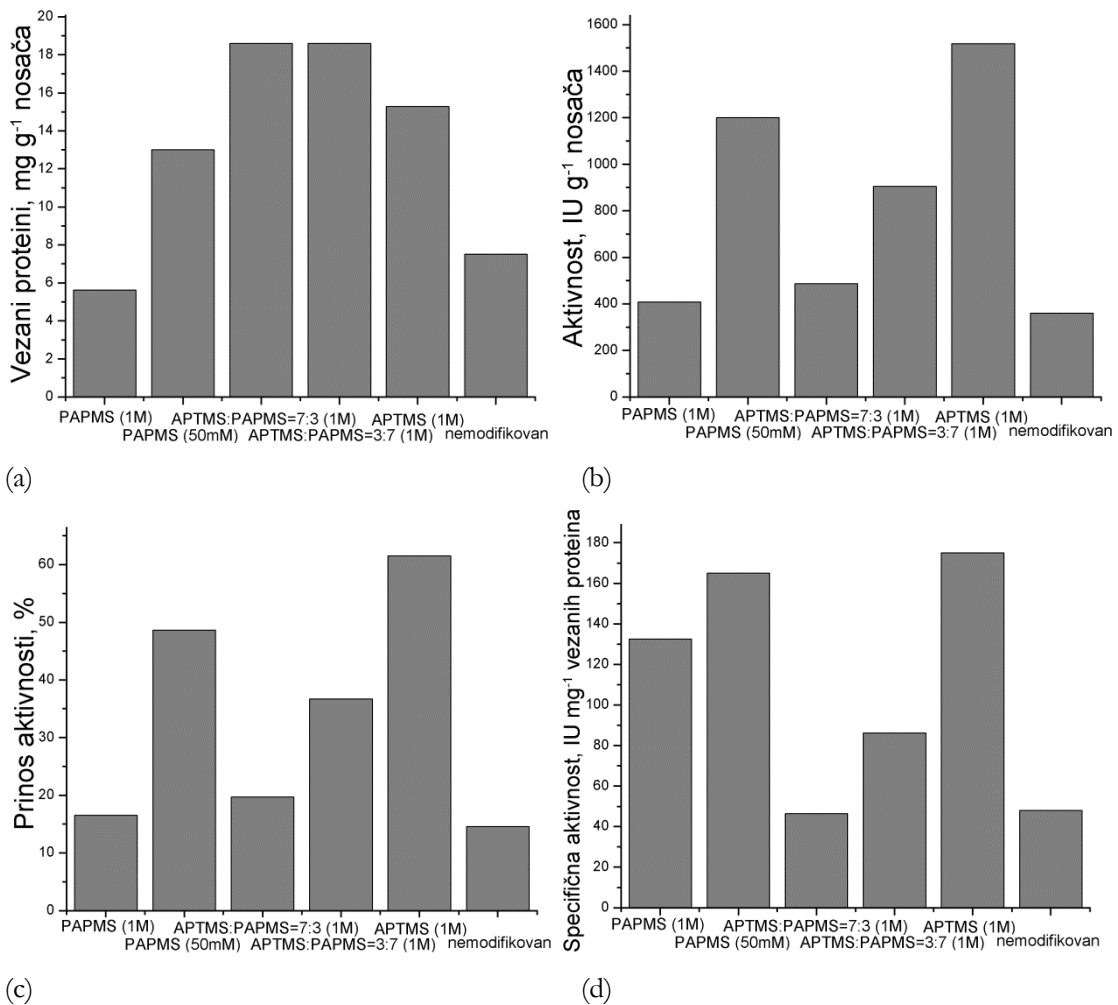
U istraživanju u kome je lipaza producenta *Chromobacterium viscorum* imobilisana na Eudragit[®] S-100 utvrđeno je da je i nakon tretiranja 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid-hidrohloridom najveći udeo interakcija između enzima i polimera hidrofobne prirode (243). Autori su ostvarili kovalentno vezivanje tek pri izvođenju imobilizacije u prisustvu 1 % Triton[®]-a X-100 i 0,5 M NaCl, ali je na taj način postignut prinos imobilizacije od samo 20 %. Takav preparat uspešno je upotrebljen u sintezi nekoliko alifatičnih estara u organskom rastvaraču (imobilisani enzim u nerastvornom obliku) i bifaznom sistemu (imobilisani enzim u rastvorenoj formi). U poređenju sa ovim rezultatima kao i rezultatima ostvarenim sa klasičnim nosačima, hidrofobna adsorpcija CAL B na Eudragit[®] S-100 se pokazala kao superiorna metoda po pitanju količine vezanih proteina, kao i hidrolitičke aktivnosti imobilisanog enzima. Za sintezu askorbil-oleata korišćen je preparat dobijen pri početnoj koncentraciji proteina od 300 mg g⁻¹ nosača, sa aktivnošću od 81226 IU g⁻¹.

4.5.3. Imobilizacija CAL B na nano-čestice silicijum-dioksida

Silika-gel spada među neorganske materijale najčešće korišćene za imobilizaciju enzima zahvaljujući svojim pogodnim karakteristikama – poseduje veliku mehaničku i termalnu stabilnost, kao i veliku specifičnu površinu, spada u biokompatibilne materijale otporne na

mikrobnu kontaminaciju i razorno dejstvo organskih rastvarača (244, 245). Poslednjih godina je u porastu i primena nano-čestica silicijum-dioksida koje imaju nekoliko prednosti u odnosu na silika-gel. Nano-čestice SiO_2 poseduju dobre fizičke karakteristike, ujednačenu veličinu i raspored pora u okviru čestica, ukoliko se radi o poroznim česticama, a zahvaljujući malim dimenzijama, čak i u slučaju neporoznih, površina raspoloživa za imobilizaciju je velika (246). Dodatne prednosti enzima imobilisanih na nano- SiO_2 čestice su povećana pH stabilnost i otpornost na delovanje organskih rastvarača i denaturišućih agenasa. Za imobilizaciju CAL B su odabrane neporozne nano-čestice silicijum-dioksida, za koje je u više publikacija pokazano da su pogodne za takvu vrstu primene (247, 248). Da bi se između enzima i čestica SiO_2 mogle uspostaviti dovoljno jake veze ili interakcije, neophodno je izvršiti modifikaciju površine, s obzirom na to da je u pitanju inertan materijal koji preko svojih silanol (Si-OH) grupa sa molekulom biokatalizatora može da uspostavi samo slabe vodonične ili elektrostatičke interakcije. Najčešće korišćena metoda modifikacije silike je reakcija silanizacije u kojoj se nosač tretira različitim agensima – silanima opšte formule RSiX_3 , gde je X grupa (uglavnom metoksi- ili etoksi-) koja nakon hidrolize reaguje sa $-\text{OH}$ grupom na površini silike, dok je R grupa određene dužine ugljovodoničnog lanca koja se završava terminalnom funkcionalnom grupom poput tiolne, karboksilne, cijano, aldehidne, amino ili fenilamino (249). Karakteristike organo grupe (vrsta funkcionalne grupe i dužina alkilnog lanca) određuju i hidrofilitnost/hidrofobnost modifikovane čestice.

Nano-čestice silicijum-dioksida su modifikovane pojedinačnim tretiranjem 3-aminopropiltrimetoksi-silanom (APTMS) i N-fenilaminopropiltrimetoksi-silanom (PAPMS), kao i njihovim smešama. Čestice na koje su tretmanom sa APTMS-om uvedene amino-grupe, dalje su pre imobilizacije lipaze tretirane cijanuril-hloridom (hlortriazinom) što je omogućilo uspostavljenje kovalentnih veza sa amino-grupama na površini enzima. Modifikacija PAPMS-om je imala za cilj da povećanjem koncentracije bočnih hidrofobnih ostataka na površini čestica omogući uspostavljanje hidrofobnih interakcija sa hidrofobnim grupama sa površine lipaze koje stabilizuju formiranje aktivne, otvorene konformacije. Imobilizacija CAL B vršena je i na nemodifikovane nano-čestice SiO_2 .



Slika 4.35. Uticaj metode modifikacije nosača na: masu vezanih proteina (a), aktivnost imobilisane lipaze (b), prinos aktivnosti (c) i specifičnu aktivnost (d) ostvarenu pri imobilizaciji CAL B na nano-SiO₂ čestice.

Imobilizacija je izvođena sa 10 mg nosača i 20 μ L tečnog enzimskog preparata CAL B i dopunjavanjem do 1 mL fosfatnim puferom definisanog molariteta (pH 7). Imobilizacija je trajala 1-24 h u zavisnosti od tipa veza čije je uspostavljanje očekivano i vršena je na 25 °C. Kao što se može uočiti sa slike 4.35.a, najviše proteina vezano je za nosače tretirane sa oba silana, zatim za nosač tretiran APTMS-om i CC-om, dok je najmanje proteina vezano za netretirani nosač i nosače tretirane PAPMS-om kod kojih je imobilizacija najkraće trajala, s obzirom na to da je očekivano vezivanje lipaze samo adsorbovanjem koje je brži proces od procesa uspostavljanja kovalentnih veza. Kada se uporede nosači tretirani PAPMS-om sa kojima je imobilizacija vršena u dva različita pufera, vidi se da je nakon jednog sata veća masa proteina vezana u puferu manje jonske jačine. Međutim, odgovarajuće aktivnosti

imobilisane lipaze i prinosi aktivnosti nisu bili proporcionalni količinama vezanih proteina (slika 4.35.b i c). Tako je najveću hidrolitičku aktivnost imao preparat za koji je enzim bio kovalentno vezan posredstvom hloridnih grupa. Nešto manju aktivnost pokazala je lipaza imobilisana u 50 mM puferu na nosač tretiran PAPMS-om, dok su preostale tri modifikacije imale značajno manju aktivnost. Male aktivnosti enzima imobilisanog u 1 M puferu na nosač tretiran PAPMS-om CAL B imobilisane na nemodifikovani nosač bile su srazmerne maloj količini vezanih proteina. Sa druge strane, dva nosača tretirana sa oba silana za koje je bila vezana gotovo ista masa proteina pokazala su drugačiju aktivnost i to takvu da je hidrofobniji imobilizat bio znatno aktivniji. Odgovarajuće specifične aktivnosti su prikazane na slici 4.35.d, i vidi se da su nosači modifikovani sa jednim od dva silana imali veću specifičnu aktivnost od onih modifikovanih sa oba silana. Moguće je da kod ovih preparata nisu svi vezani proteini mogli da pokažu svoju katalitičku aktivnost zbog postojanja difuzionih limitacija koje su onemogućile pristup molekulima supstrata do aktivnih centara lipaze. Na osnovu ostvarenih rezultata, za testiranje u reakciji sinteze askorbil-oleata odabrana su dva preparata sa najvećom hidrolitičkom aktivnošću – CAL B imobilisana u 50 mM puferu na nano-SiO₂ čestice modifikovane PAPMS-om aktivnosti 1200,2 IU g⁻¹ nosača i CAL B imobilisana u 1 M puferu na nano-SiO₂ čestice modifikovane APTMS-om i CC-om aktivnosti 1518,6 IU g⁻¹ nosača. Pored ova dva preparata, u reakciji je isprobana i lipaza imobilisana na nemodifikovane nano-čestice SiO₂ aktivnosti 360,1 IU g⁻¹. Na taj način su testirana dva nosača (jedan hidrofilan i jedan hidrofoban) na koje je CAL B bila adsorbovana i jedan na koji je CAL B vezana kovalentno.

4.5.4. Imobilizacija lipaze na Purolite[®] nosače

Adsorptivna imobilizacija CAL B vršena je na dva komercijalna nosača na bazi stiren-divinilbenzena: Purolite[®] A109 i Purolite[®] MN102. Nosači iz ove serije su interesantni za upotrebu u imobilizaciji enzima jer, zahvaljujući nešto većim dimenzijama, olakšavaju razvoj reaktora sa imobilisanim enzimima jer se javljaju manji padovi pritiska pri proticanju tečne faze kroz sloj imobilisanog enzima. Pored toga, uvođenjem odgovarajućih funkcionalnih grupa, Purolite[®] A109 može preko svojih primarnih amino-grupa biti modifikovan tako da se omogući kovalentno vezivanje, pa je pored nemodifikovanog ispitana i njegova modifikovana forma.

Purolite[®] A109 predstavlja makroporoznu jonoizmenjivačku smolu sačinjenu od polistirena umreženog pomoću divinilbenzena (250). Velika poroznost ovog polimera

omogućava veoma dobro uklanjanje organskih materija iz vodenih i organskih rastvora pri čemu se te materije lako kasnije oslobađaju sa nosača u procesu njegove regeneracije. Prisustvo slabo bazne funkcionalne grupe obezbeđuje veliki kapacitet polimera za neke specifične anjone kao i veliku sposobnost obnavljanja. Purolite® A109 ima odličnu hemijsku i termičku stabilnost kao i otpornost prema usitnjavanju (habanju) i osmotskom šoku. Ove osobine čine ovu smolu idealnom za upotrebu u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji za neutralizaciju jakih kiselina kao i za druge procese. Veoma je pogodan jonoizmenjivač za proces dekolorizacije natrijum-glutamata zbog mogućnosti višestruke regeneracije. Takođe se može koristiti za prečišćavanje limunske kiseline, imobilizaciju enzima i prečišćavanje metala. Purolite® A109 je u obliku kuglica srednjeg prečnika između 425 i 1000 µm (250).

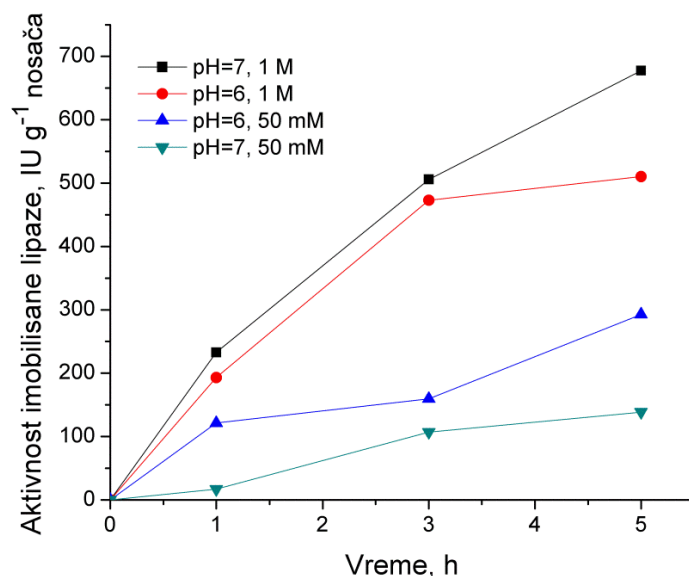
Purolite® MN102 je po sastavu kopolimer stirena i divinilbenzena koji poseduje tercijarne amino-grupe (251). Izuzetno je hidrofoban pa se primenjuje za adsorpciju/separaciju hidrofobnih organskih molekula velike molekulske mase u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Veoma je rasprostranjena njegova upotreba u otklanjanju limonena i naringina iz različitih voćnih sokova u toku prerade u cilju smanjivanja njihove gorčine. Lako se regeneriše tretiranjem toplim vodenim ili alkoholnim rastvorima baza. Posедуje veliku hemijsku i termičku stabilnost, kao i dobre mehaničke karakteristike. Čestice su sferične, prečnika 535 ± 85 µm što ih čini pogodnim za kasniju primenu i u šaržnim ili protočnim reaktorima sa mešanjem, kao i u reaktorima sa pakovanim i fluidizovanim slojem. Imaju veoma razvijenu površinu ($700 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) pri čemu mikro- (poluprečnika 1,5 nm) i mezo-/makro-pore (poluprečnika 60-90 nm) čine udeo od 1-1,1 mL g^{-1} (251).

Imobilizacija CAL B na nemodifikovani Purolite® A109, kao i Purolite® A109 modifikovan epihlor-hidrinom je ranije optimizovana, pa su u okviru ove disertacije primenjeni uslovi pod kojima su dobijeni najaktivniji preparati (25). Karakteristike preparata dobijenih pod optimalnim uslovima prikazane su u tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Uslovi i rezultati imobilizacije CAL B na Purolite® A109.

Nosač i uslovi imobilizacije	c_0 (mg g^{-1})	P_v (mg g^{-1})	Y_I (%)	A (IU g^{-1})	Y_A (%)	SA (IU mg^{-1})
Purolite® A109	22,5	4,96	22,0	12,8	1,82	2,58
epoksi-Purolite® A109	22,5	5,47	24,3	47,5	6,75	8,68

c_0 – početna koncentracija proteina, P_v – vezani proteini, Y_I – prinos imobilizacije, A – aktivnost imobilisane lipaze, Y_A – prinos aktivnosti, SA – specifična aktivnost.



Slika 4.36. Tok imobilizacije CAL B na Purolite® MN102 u puferima različite jonske jačine i pH vrednosti.

Sa obzirom na to da je Purolite® MN102 po prvi put upotrebljen za imobilizaciju enzima, sa ovim nosačem je imobilizacija izvođena na dve različite pH vrednosti (6 i 7) i u rastvorima različitih jonskih jačina (50 mM i 1M). Aktivnost dobijenih preparata određivana je nakon različitih vremenskih perioda trajanja imobilizacije, od 1 do 5 h, a u smešu za imobilizaciju je unošena koncentracija proteina od 18,75 mg g⁻¹ nosača. I pH vrednost i molaritet pufera za imobilizaciju pokazali su značajan uticaj na aktivnost imobilizata (slika 4.36.). Interesantno je da je u 1 M puferu na pH 7 dobijen preparat sa najvećom aktivnošću (677,6 IU g⁻¹), dok je na istom pH, ali u puferu nižeg molariteta, imobilisani enzim imao najmanju aktivnost – 138,7 IU g⁻¹. Ovakav rezultat ukazuje na mogućnost učestvovanja elektrostatickih interakcija u vezivanju lipaze, s obzirom na suprotno naelektrisanje molekula enzima i površine nosača na pH 7. Očekivano je da je udeo ovih interakcija veći u rastvoru manje jonske jačine, dok u puferima većeg molariteta one bivaju potisnute i preovladavaju znatno pogodnije hidrofobne interakcije. Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da je hidrofobna adsorpcija pogodnija za postizanje visoke aktivnosti imobilisanog enzima. Na pH 6 je uočen isti trend – aktivniji imobilizat je dobijen u puferu veće jonske jačine, a ostvareni su nešto lošiji rezultati nego pri pH 7. Kada se uporede dva ispitivana nosača evidentno je da se korišćenjem Purolite®-a MN102 dobija znatno aktivniji imobilisani preparat, što takođe ukazuje na superiornost hidrofobnih interakcija u odnosu na elektrostaticke pri imobilizaciji ovog enzima.

Kada se uporede aktivnosti tri preparata dobijena imobilizacijom na Purolite® nosače, očigledno je da je izrazito hidrofobni nosač posedovao najveću vezanu aktivnost (za red veličine veću od druga dva), iako su vezane mase proteina bile uporedive (35-40 % manje za nosače manje hidrofobnosti). Objašnjenje ovakvog rezultata verovatno leži u činjenici da je vezivanje lipaza za hidrofobne površine obično pogodno za njihovo katalitičko delovanje. Takođe je uočljiva gotovo četverostruko veća aktivnost lipaze kovalentno vezane posredstvom epoksidnih grupa u odnosu na enzim vezan za nemodifikovani Purolite® A109, što dokazuje da je modifikovanje površine nosača uvođenjem funkcionalnih grupa na njegovu površinu bilo opravdano. U reakciji sinteze askorbil-oleata testirana je esterifikaciona aktivnost oba Purolite® A109 preparata i preparat CAL B imobilisane na Purolite® MN102 hidrolitičke aktivnosti 677,6 IU g⁻¹ dobijen nakon 5 h u 1 M puferu pH 7.

4.5.5. Ispitivanje aktivnosti imobilisanih preparata u reakciji esterifikacije vitamina C i oleinske kiseline

U prethodnom poglavlju prikazana je i opisana mogućnost imobilizacije CAL B na nekoliko komercijalnih, modifikovanih i nemodifikovanih, nosača. Utvrđeni su uslovi dobijanja i odgovarajuće hidrolitičke aktivnosti preparata. S obzirom na to da je krajnji cilj primena ovih imobilizata u sintezi estara vitamina C, odabrani preparati (tabela 4.8.) su ispitani u reakciji dobijanja L-askorbil-oleata kao model reakciji.

Tabela 4.8. Karakteristike imobilisanih preparata primenjenih u reakciji sinteze L-askorbil-oleata.

Nosač i uslovi imobilizacije	c ₀ (mg g ⁻¹)	P _v (mg g ⁻¹)	Y _I (%)	A (IU g ⁻¹)	Y _A (%)	SA (IU mg ⁻¹)
Purolite® A109	22,5	4,96	22,0	12,8	1,82	2,58
epoksi-Purolite® A109	22,5	5,47	24,3	47,5	6,75	8,68
Purolite® MN102	18,75	8,41	44,9	677,6	36,5	80,57
Eupergit® C250L	19,6	14,9	76,1	1226,8	35,5	82,2
Eudragit® S-100*	300	212,0	70,6	81226	127,0	383,1
nano-SiO₂ (50 mM)	24,68	7,50	30,4	360,1	14,6	48,01
nano-SiO₂-PAPMS (50 mM)	24,68	13,0	52,7	1200,2	48,6	164,9
nano-SiO₂-APTMS (1 M)	24,68	15,27	61,9	1518,6	61,5	175

c₀ – početna koncentracija proteina, P_v – vezani protein, Y_I – prinos imobilizacije, A – aktivnost imobilisane lipaze, Y_A – prinos aktivnosti, SA – specifična aktivnost.

Uslovi izvođenja reakcije odabrani su na osnovu prethodno opisane optimizacije (poglavljje 4.3.2.), a primenjena aktivnost enzima je iznosila 7,5 IU mL⁻¹ (23 IU mL⁻¹ sa Eudragit®-om S-100). Iz tabele 4.9. u kojoj su sumirani prinosi estera u reakciji katalizovanoj različitim

preparatima vidi se da su svi odabrani imobilizati pokazali određenu aktivnost, ali da je ona bila veoma različita. Najmanji prinos postignut je sa najmanje aktivnim Purolite[®]-om A109 – 4,9 mM. Iako je u reakcionu smešu unosen isti broj jedinica, masa imobilizata koja je u slučaju ovog nosača to omogućavala bila je nekoliko puta veća u odnosu na masu imobilizata slične granulacije (Purolite[®] A109 sa epoksidnim grupama i Purolite[®] MN102). Isti nosač na koji su bile uvedene epoksidne grupe i za koji je enzim bio kovalentno vezan, u reakciji esterifikacije je pokazao skoro tri puta veću aktivnost. Slični rezultati (10-20 mM estera) ostvareni su i kada su kao katalizatori korišćeni preparati CAL B imobilisane na Eupergit[®] C250L, Eudragit[®] S-100, netretirane nano-SiO₂ čestice i nano-SiO₂ čestice tretirane APTMS-om. Nabrojani imobilizati su se pokazali kao lošiji izbor od komercijalnog Novozym[®]-a 435 sa kojim je pod opisnim uslovima ostvaren prinos od 24,9 mM estera. Nekoliko je mogućih uzroka ovakvih rezultata. Eupergit[®] C250L i Purolite[®] A109, kao što je već opisano, poseduju poroznu površinu pa je očekivano da se veliki deo imobilisanog enzima nalazi u porama u dubljim slojevima čestica gde je teže dostupan molekulima supstrata (240). Kada je korišćena lipaza imobilisana na Eudragit[®] S-100, uočena je aglomeracija, verovatno uzrokovana niskom pH reakcione sredine. Pri takvim reakcionim uslovima, iako je u reakcionu smešu unet veliki broj jedinica aktivnosti, nije se moglo očekivati da će polimer biti rastvoran, što bi u potpunosti isključilo mogućnost pojave difuzionih limitacija. Međutim “grupisanje” čestica učinilo je veliku količinu molekula lipaze nedostupnim za vezivanje supstrata, pa je i prinos L-askorbil-oleata mali uprkos velikoj hidrolitičkoj aktivnosti imobilizata. Sa druge strane, lipaza imobilisana na Purolite[®] MN102 i nano-čestice SiO₂ modifikovane PAPMS-om pokazala je sličnu ili veću aktivnost nego komercijalni preparat tako da je dobijeno 28,3 mM i 23,4 mM L-askorbil-oleata, redom. U slučaju Purolite[®]-a MN102, iako je u pitanju makroporozan nosač pa postoji mogućost pojave ograničenja u prenosu mase, ona je veoma mala s obzirom na dimenzije pora ovog nosača. Naime, mikropore su previše malih dimenzija da bi enzim mogao da uđe u njih (CAL B dimenzija 3×4×5 nm, a pore prečnika 3 nm), dok su mezo- i makropore prečnika između 120 i 180 nm velike u poređenju sa sličnim poroznim nosačima (čak 10 puta veće nego pore Lewatit[®]-a VP OC 1600 na koji je CAL B imobilisana u Novozym[®]-u 435) pa je pojava difuzionih limitacija malo verovatna. Međutim, najznačajnija razlika Purolite[®]-a MN102 u odnosu na ostale testirane nosače jeste izrazito hidrofobna površina, koja se smatra pogodnom za izvođenje reakcija katalizovanih lipazama, naročito reakcija esterifikacije jer je niža koncentracija vode na

površini čestice i smanjena brzina povratne hidrolize. Takođe je i tretman čestica SiO₂ PAPMS-om učinio njihovu površinu hidrofobnom, pa je potvrđeno da je uspostavljanje hidrofobnih interakcija dobar način za dobijanje visoko-aktivnih imobilisanih lipaza.

Tabela 4.9. Prinos *L*-askorbil-oleata nakon ~24 h u reakciji katalizovanoj lipazom B iz *C. antarctica* imobilisanom na različite nosače.

Nosač	Koncentracija askorbil-oleata, mM
Lewatit® VP OC 1600 (Novozym® 435)	24,9
Purolite® A109	4,9
epoksi-Purolite® A109	14,6
Purolite® MN102	28,3
Eupergit® C250L	11,9
Eudragit® S-100*	17,5
nano-SiO ₂	9,9
nano-SiO ₂ -PAPMS (50 mM)	23,4
nano-SiO ₂ -APTMS (1 M)	10,2

* - uneto 23 IU mL⁻¹ smeše.

Konačan izbor za dalji rad koji uključuje i izvođenje reakcije u protočnom reaktorskom sistemu bio je preparat dobijen hidrofobnom adsorpcijom CAL B na Purolite® MN102, kako zbog visokog prinosa postignutog u preliminarnim eksperimentima, niže cene i jednostavnijeg postupka imobilizacije u odnosu na korišćenje nano-čestica, tako i zbog fizičkih karakteristika koje omogućavaju lakši rad i u šaržnim i u semi-kontinualnim uslovima. Naime, i pored brojnih prednosti korišćenja nano-čestica kao nosača za imobilizaciju enzima, uočene su teškoće u manipulaciji pri radu sa njima kao što su separacija nakon imobilizacije i sušenja, teško formiranje stabilnog fluidizovanog sloja i gubici pri odvajanju od reakcione smeše u cilju višekratne upotrebe. Dalji koraci su stoga bili usmereni na detaljniju optimizaciju uslova za imobilizaciju CAL B na Purolite® MN102, kako bi u narednim fazama ispitivanja bio primenjivan preparat sa maksimalnom aktivnošću.

4.5.6. Imobilizacija CAL B na Purolite® MN102

4.5.6.1. Optimizacija uslova za imobilizaciju CAL B na Purolite® MN102

U fazi optimizovanja uslova pod kojima je vršena imobilizacija lipaze CAL B, čiji je cilj bilo dobijanje što aktivnijeg imobilizata, varirano je nekoliko značajnih parametara: jonska jačina i pH pufera u kome se vrši imobilizacija, koncentracija enzima i vreme trajanja

imobilizacije. Praćen je uticaj na imobilisanu enzimsku aktivnost standardnom metodom hidrolize *p*-NPB-a.

Tabela 4.10. Uticaj jonske jačine i pH vrednosti pufera za imobilizaciju na aktivnost imobilisane lipaze.

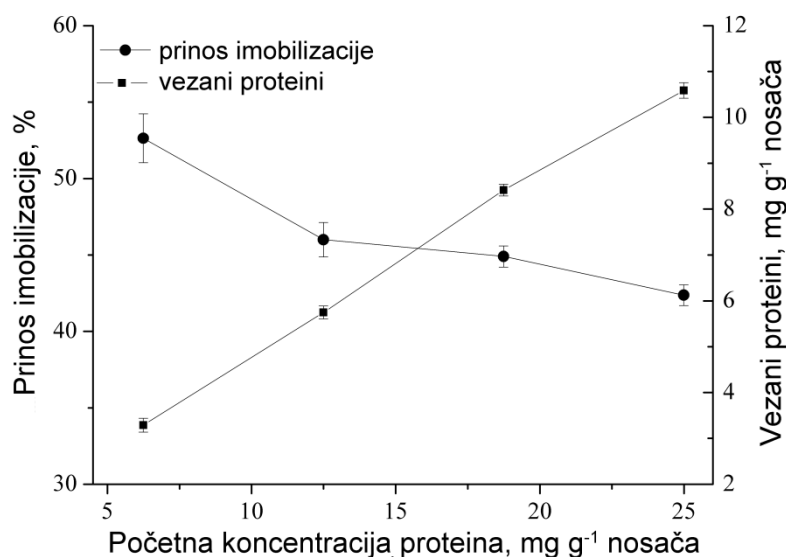
Jonska jačina ¹ , M	Aktivnost IU g ⁻¹
0,05	134,1±6,1
0,2	184,6±5,6
0,5	431,9±7,2
1	677,6±11,2
pH ²	Aktivnost, IU g ⁻¹
5	298,9±4,4
6	510,2±6,3
7	677,6±11,2
8	259,1±7,8

Imobilizacija je izvođena pri početnoj koncentraciji proteina od 18,75 mg g⁻¹ nosača u toku 5 h na 25 °C.

¹ - pH=7, ² - 1 M.

S obzirom na to da je nosač primenjen za imobilizaciju, Purolite[®] MN102, hidrofobne prirode, ali da poseduje i naelektrisane grupe u svojoj strukturi, molaritet i pH pufera u kome se vrši imobilizacija morali su biti optimizovani. U ovom delu istraživanja, najpre je ispitan uticaj jonske jačine pufera izvođenjem imobilizacije u puferima molariteta 0,05 M, 0,2 M, 0,5 M i 1 M. U čitavom ispitivanom opsegu, kao što se može videti u tabeli 4.10., aktivnost dobijenog imobilizata raste sa povećanjem jonske jačine pufera za imobilizaciju, pa se preparat maksimalne aktivnosti dobija u jednomolarnom puferu. Može se pretpostaviti da se pri nižim koncentracijama soli između molekula enzima i površine nosača ostvaruju elektrostatičke interakcije sa pozitivno naelektrisanim tercijarnim amino-grupama, dok pri većim jonskim jačinama prevladavaju hidrofobne interakcije koje pogoduju katalitičkom delovanju lipaza. Za razliku od ovih rezultata, u prethodnim istraživanjima u kojima su korišćeni hidrofobni nosači koji ne poseduju naelektrisane grupe u svojoj strukturi (oktil-Sefaroza, nano-polistiren) visoke aktivnosti imobilizata su dobijane i u puferima nižeg molariteta (67, 113, 209). S obzirom na aktivnosti dobijenih imobilizata, dalji eksperimenti izvođeni su u 1 M fosfatnom puferu. Ispitivan je i uticaj pH pufera za imobilizaciju u opsegu od pH 5 do pH 8. Kada dolazi do ostvarivanja hidrofobnih interakcija u rastvorima velike jonske jačine, pH rastvora obično nije od velike važnosti s obzirom na to da se pri takvim uslovima elektrostatičke interakcije značajno redukovane. Iz tabele 4.10. se može videti da pri porastu pH od 5 do 6 dolazi do malog rasta aktivnosti, zatim se pri pH 7 aktivnost uvećava gotovo dvostruko, da bi dalje povećanje pH do 8 dovelo do naglog pada aktivnosti imobilizata. Istovremeno je količina vezanih proteina bila

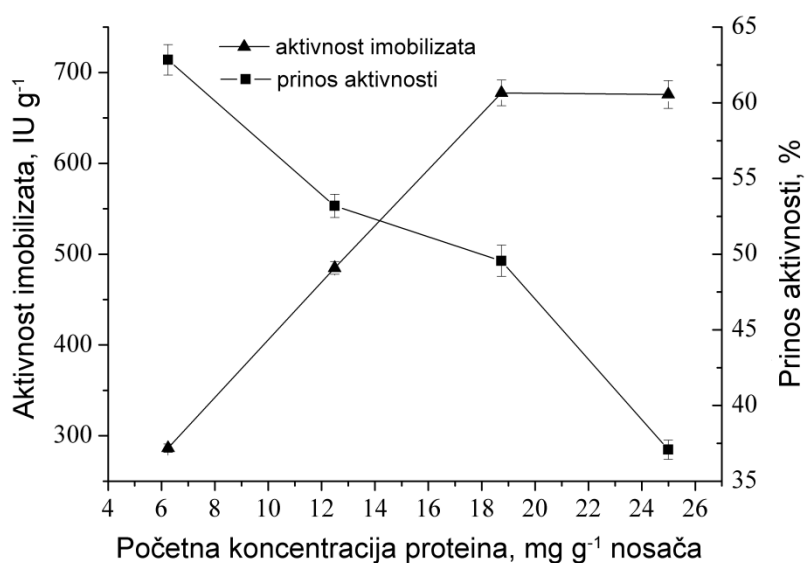
gotovo nezavisna od pH imobilizacije. Ostvareni rezultat pokazuje da se imobilizat najveće aktivnosti dobija na pH nešto iznad izoelektrične tačke CAL B ($pI=6$), verovatno zbog pogodne raspodele naelektrisanja aminokiselinskih ostataka koja obezbeđuje zadržavanje aktivne konformacije molekula enzima. I u prethodnim istraživanjima u kojima je lipaza tipa B iz *C. antarctica* imobilisana na hidrofobne nosače, preparati najveće aktivnosti dobijani su kada je imobilizacija izvođena na pH 6,8-7 (67, 113, 209).



Slika 4.37. Uticaj početne koncentracije proteina na prinos imobilizacije i masu vezanih proteina po gramu nosača. Imobilizacija je izvođena u 1 M puferu pH 7 u toku 5 h na 25 °C.

Nakon izbora pufera za imobilizaciju – 1 M, pH 7, ispitan je uticaj koncentracije lipaze na aktivnost dobijenog imobilizata, kao i na prinos imobilizacije. Količina tečnog enzimskog preparata varirana je u opsegu 5-20 %(v/v) što odgovara koncentraciji proteina od 6,25 do 25 mg po gramu nosača. Na slici 4.37. je predstavljen uticaj ponuđene količine proteina za imobilizaciju na stepen vezivanja za nosač. Uočava se da u ispitivanom opsegu sa porastom koncentracije proteina raste masa lipaze vezane po gramu nosača, dok odgovarajući prinosi imobilizacije (izraženi kao % vezanih u odnosu na ponuđene proteine) opadaju. Aktivnost istih imobilisanih preparata analizirana je u reakciji hidrolize *p*-NPB-a, i predstavljena kao aktivnost po gramu nosača i procenat vezane aktivnosti u odnosu na ponuđenu (slika 4.38.). Sa povećanjem koncentracije lipaze do 18,75 mg g⁻¹ nosača, uočava se linearan porast aktivnosti imobilizata od 286,4 do 677,6 IU g⁻¹, dok pri daljem porastu početne količine proteina aktivnost dobijenog imobilisanog enzimskog preparata ostaje gotovo konstantna. U isto vreme, u ispitivanom opsegu, sa porastom

koncentracije proteina dolazi do smanjenja prinosa aktivnosti od 46,3 do 27,3 %. Odgovarajuće specifične aktivnosti pokazuju da pri većim količinama vezanih proteina porast adsorbirane količine lipaze ne dovodi do proporcionalnog povećanja aktivnosti, što se najčešće pripisuje narušavanju trodimenzionalne strukture enzima u slučajevima kada nosač postaje “prenatran” proteinima (25). S obzirom na to da je neophodno napraviti kompromis između dva suprotstavljena zahteva za postizanjem što većeg prinosa aktivnosti i dobijanja imobilizata što veće aktivnosti po gramu nosača, za dalje eksperimente je odabrana koncentracija lipaze od 18,75 mg g⁻¹ pri kojoj je dobijen preparat sa aktivnošću od 677,6 IU g⁻¹ nosača.

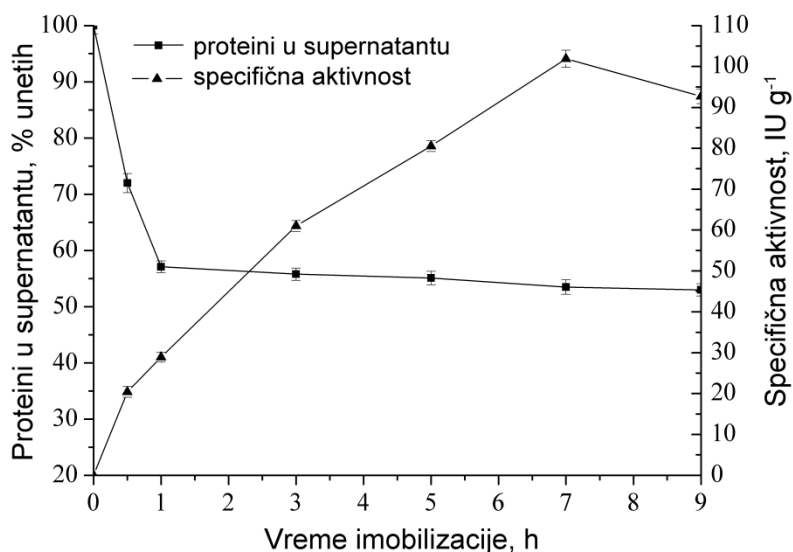


Slika 4.38. Uticaj početne koncentracije proteina po gramu nosača na prinos aktivnosti i aktivnost imobilizata. Imobilizacija je izvođena u 1 M puferu pH 7 u toku 5 h na 25 °C.

U poslednjem koraku utvrđivanja najpogodnijih uslova imobilizacije, vezivanje CAL B za nosač praćeno je u toku vremena. Pad proteina u supernatantu i odgovarajuće specifične aktivnosti imobilizata (IU mg⁻¹ vezanih proteina) nakon 0,5 do 9 h imobilizacije prikazani su na slici 4.39. U toku prvog sata, evidentan je nagli pad sadržaja proteina u supernatantu, nakon čega koncentracija nevezanih proteina ostaje gotovo konstantna u toku preostalih 8 sati. Nasuprot tome, kontinualan rast specifične aktivnosti imobilisane lipaze primetan je u toku prvih 7 h imobilizacije, kada dostiže vrednost od 102 IU mg⁻¹. Ovaj rezultat je bio donekle neočekivan, kada se uzmu u obzir rezultati ranijih studija u kojima je adsorpcija lipaza na hidrofobne nosače uglavnom u potpunosti završavana u toku jednog sata ili manje. S obzirom na to da je sadržaj proteina u supernatantu veoma brzo pao i nadalje

ostao na konstantnoj vrednosti, može se pretpostaviti da se kapacitet nosača vrlo brzo popunjava. Međutim, dalja inkubacija dovodi do povećanja aktivnosti preparata koja nije uzrokovana većom količinom vezanih proteina, već, verovatno, nekom vrstom konformacionih promena koje se dešavaju u molekulu lipaze vezanom za hidrofobnu površinu nosača. Može se pretpostaviti da se adsorpcija CAL B na Purolite[®] MN102 može odigravati posredstvom različitih mehanizama. Pored hidrofobnih interakcija između izrazito hidrofobne površine nosača i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka molekula lipaze, postoji i mogućnost uspostavljanja elektrostatičkih interakcija enzima sa pozitivno naelektrisanim tercijarnim amino-grupama nosača, s obzirom na činjenicu da je imobilizacija izvođena pri pH nešto višem od izoelektrične tačke CAL B. U početnoj fazi “brze adsorpcije” se vezivanje moglo odvijati preko oba mehanizma, dok se u kasnijim fazama enzim pravilno orijentiše i trpi konformacione promene usled promene vrste interakcija što dovodi do rasta aktivnosti. S obzirom na to da je poznato da lipaze podležu hiperaktivaciji pri adsorbovanju na hidrofobne površine uzrokovanoj zauzimanjem aktivne konformacije sa otvorenim “poklopcem”, pretpostavljeno je da u prvim fazama dominira adsorbovanje molekula lipaze posredstvom elektrostatičkih sila nakon čega se ostvaruju hidrofobne interakcije, dovodeći do porasta aktivnosti imobilizata. Ova hipoteza je proverena dodatnim eksperimentom u okviru kojeg je izvedena selektivna desorpcija surfaktantom – Triton[®]-om X-100 u cilju desorbovanja hidrofobno adsorbovanog enzima sa dva imobilisana preparata dobijena nakon različitih vremena imobilizacije – nakon 1 h i nakon 7 h. Kod preparata dobijenog posle 7 h u toku tretmana je desorbovano 99,5 % proteina sa nosača, dok je sa biokatalizatora dobijenog nakon 1 h imobilizacije desorbovano samo 8 % lipaze adsorbovane na površini čestica. Ostvareni rezultati pokazuju da je udeo hidrofobno vezane lipaze nakon 7 h značajno veći nego nakon prvog sata imobilizacije, potvrđujući da je promena tipa interakcija između enzima i nosača odgovorna za povećanje aktivnosti.

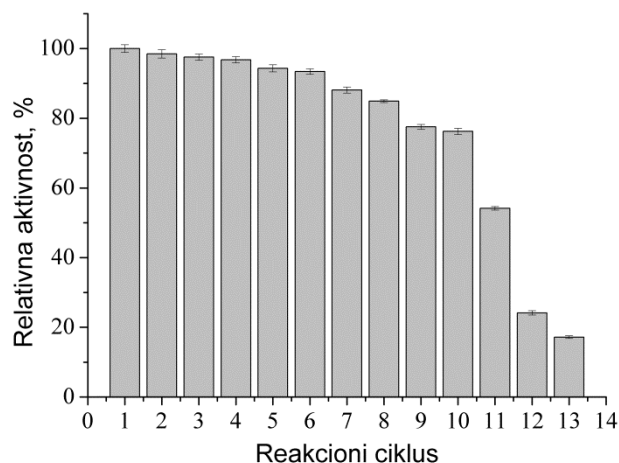
Preparat CAL B imobilisan na Purolite[®] MN102 maksimalne aktivnosti od 888,4 IU g⁻¹ nosača je tako dobijen nakon 7 h, u jednomolarnom fosfatnom puferu (pH=7), pri početnoj koncentraciji proteina od 18,75 mg g⁻¹ nosača. Ovaj preparat je korišćen u daljim eksperimentima.



Slika 4.39. Uticaj vremena imobilizacije na koncentraciju proteina zaostalih u supernatantu i specifičnu aktivnost dobijenog imobilizata. Imobilizacija je izvođena pri početnoj koncentraciji proteina od 18,75 mg g⁻¹ nosača, u 1 M puferu pH 7 na 25 °C.

4.5.6.2. Ispitivanje operativne stabilnosti imobilisanog enzima u sintezi L-askorbil-oleata

Dobijeni preparat najveće aktivnosti testiran je u reakciji sinteze L-askorbil-oleata u *t*-butanolu pod prethodno optimizovanim uslovima (0,135 M vitamina C, molski odnos 1:8, 60 °C, bez dodavanja vode) primenom biokatalizatora u konsektivnim reakcionim ciklusima. Dobijeni rezultati, izraženi kao relativna aktivnost imobilisane lipaze prikazani su na slici 4.40. Preparat je pokazao dobru operativnu stabilnost, s obzirom na to da je u prvih 10 ciklusa (~200 h) relativna aktivnost pala za oko 25 %. Nakon toga je usledio brži pad katalitičke aktivnosti lipaze. Slični rezultati su već ranije objavljivani, ali je obično rađeno sa većim količinama CAL B i/ili su reakcioni ciklusi trajali znatno kraće. U poređenju sa rezultatima ostvarenim kada je u prethodnom delu istraživanja korišćen Novozym[®] 435 i kada je nakon 10 ciklusa upotrebe aktivnost biokatalizatora pala na 48 % od početne, jasno je da CAL B imobilisana na Purolite[®] MN102 poseduje značajno veću operativnu stabilnost. Ipak treba napomenuti da je brža inaktivacija Novozym[®]-a 435 verovatno delimično bila uzrokovana i razlikom u polarnosti medijuma, s obzirom na to da su sa tim preparatom reakcije izvođene u acetonu. Ukupan prinos estra ostvaren sa jednom šaržom enzima iznosio je 179,4 mmol (78,9 g) po gramu imobilisane lipaze.



Slika 4.40. Operativna stabilnost CAL B imobilisane na Purolite® MN102 u reakciji sinteze L-askorbil-oleata.

4.5.6.3. Procena troškova dobijanja CAL B imobilisane na Purolite® MN102

Na kraju ovog dela istraživanja, primenjen je jednostavan metod za procenu troškova dobijanja imobilisanog biokatalizatora u cilju utvrđivanja potencijala za njegovu ekonomičnu primenu. Svi operativni troškovi, kao i troškovi materijala korišćenih za imobilizaciju uzeti su u obzir, a za izračunavanje je primenjena sledeća jednačina (252):

$$C = \frac{C_{lipaza}m_{lipaza} + C_{nosač}m_{nosač} + C_{aditivni,operativni\ troškovi}(\text{€})}{m_{imobilisana\ lipaza}}$$

gde je C (€ g^{-1}) cena lipaze, nosača i imobilisane lipaze, a m (g) njihova masa. U proračunu su primenjene cene nosača, tečnog enzimskog preparata i Novozym®-a 435 kada se oni nabavljaju u količinama koje odgovaraju proizvodnji na industrijskom novou. Određeno je da je cena CAL B imobilisane na Purolite® MN102 251 € kg^{-1} tj. 0,28 € kIU^{-1} . U poređenju sa Novozym®-om 435, čija je cena oko 790 € kg^{-1} , što je ekvivalentno ceni od 0,99 € kIU^{-1} (aktivnost određena na isti način u reakciji hidrolize *p*-NPB), očigledno je da je cena imobilisanog preparata znatno niža što ga čini potencijalno pogodnim i za dobijanje različitih proizvoda u industrijskim razmerama.

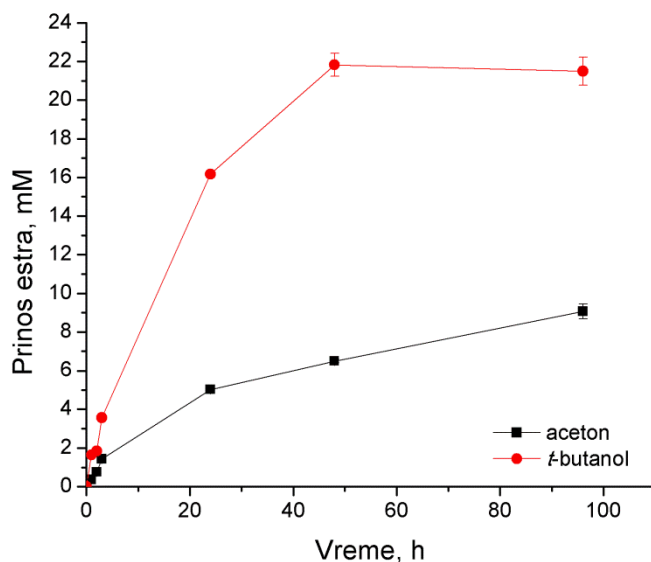
4.6. Sinteza L-askorbil-oleata katalizovana lipazom tipa B iz kvasca *C. antarctica* imobilisanom na Purolite® MN102 u šaržnom bioreктору i bioreктору sa fluidizovanim slojem

Eksperimenti izvedeni u okviru prethodnog dela ove disertacije fokusirani su na enzimski katalizovanu esterifikaciju vitamina C u šaržnom sistemu. Poznato je da se u protočnim reaktorskim sistemima sa pakovanim i fluidizovanim slojem imobilisanog biokatalizatora mogu ostvariti velike produktivnosti po masi enzima, pa je u narednom delu istraživanja reakcija sinteze askorbil-oleata izvođena i na ovaj način. Postoje brojne prednosti izvođenja reakcija u fluidizovanom u odnosu na pakovani sloj kada su u pitanju protočni sistemi, pa je za dalji rad i poređenje sa šaržnim sistemom odabrana upravo ta konfiguracija (253, 254). U fluidizovanom sloju se ostvaruje mnogo bolji kontakt između čvrstih čestica i fluidizacionog medijuma (gasa ili tečnosti), što omogućava efikasniji prenos mase. Na taj način se postiže i znatno bolji prenos toplote u samom sistemu, kao i između zidova kolone i duplikatora, pa je izbegnuta termalna neuniformnost. Kao katalizator u prethodnom delu studije je korišćen komercijalni imobilisani enzimski preparat Novozym® 435, dok je kao enzim sa najvećim potencijalom za širu primenu među više preparata dobijenih imobilizacijom CAL B na različite nosače za dalji rad odabrana lipaza imobilisana na Purolite® MN102. Ovaj preparat je odabran zato što su ukupni procenjeni troškovi njegovog dobijanja bili znatno niži u odnosu na komercijalni preparat Novozym® 435, a njegove performanse uporedive ili bolje od komercijalnog kada je testiran u reakciji sinteze L-askorbil-oleata u šaržnom sistemu. Takođe, zbog već opisanih dobrih mehaničkih svojstava nosača, dobijeni imobilizat je predstavljao pravi izbor za rad u protočnim sistemima. Pored toga, u preliminarnim eksperimentima je ustanovljeno da čestice Purolite®-a MN102 formiraju uniformniji sloj prilikom fluidizovanja i da su brzine odnošenja veće, verovatno zbog uniformnije raspodele veličine čestica.

4.6.1. Optimizacija uslova sinteze L-askorbil-oleata katalizovane lipazom tipa B iz *C. antarctica* imobilisanom na Purolite® MN102

Prvo su u cilju izbora pogodne reakcione sredine testirana dva rastvarača koja su se pokazala kao odgovarajući medijumi za sintezu L-askorbil-oleata katalizovanu komercijalnim enzimskim preparatom – acetom i *t*-butanol. Na slici 4.41. su predstavljeni reakcioni tokovi pri korišćenju ova dva rastvarača i uočava se da se u *t*-butanolu postižu

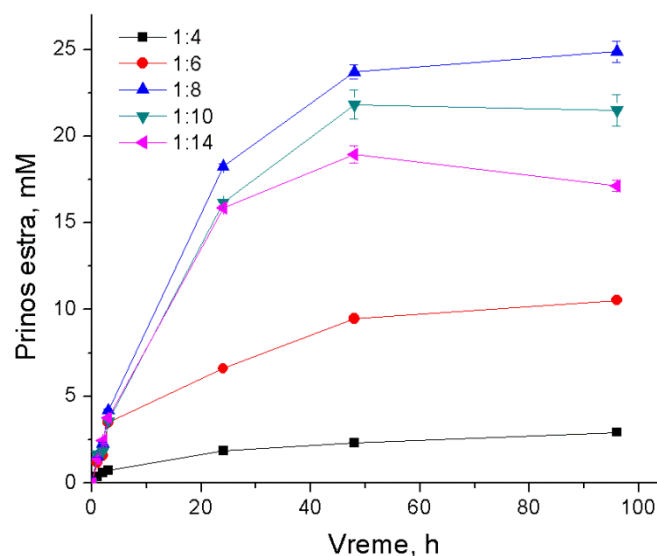
veće početne brzine i krajnji prinosi proizvoda nego u acetonu, što je u skladu sa rezultatima ostvarenim kada je kao katalizator korišćen Novozym[®] 435. U tom delu studije su obrazložene sve prednosti korišćenja acetona kao rastvarača u enzimskim sintezama estara, međutim u ovoj fazi istraživanja je zbog specifičnosti rada u protočnim sistemima napravljen drugačiji izbor. Kao rastvarač je u ovoj fazi istraživanja korišćen *t*-butanol, i to iz nekoliko razloga. Kada se reakcija izvodi u protočnim reaktorima sa recirkulacijom reakcione smeše veća je mogućnost isparavanja rastvarača pod operativnim uslovima, što aceton, rastvarač u kome su izvođeni prethodni eksperimenti u šaržnom sistemu, čini nepogodnim za upotrebu zbog tačke ključanja veoma bliske radnim temperaturama (temperatura ključanja *t*-butanola je za oko 25 °C viša od tačke ključanja acetona). Takođe, rastvorljivost vitamina C u *t*-butanolu je veća, što omogućava rad sa većim koncentracijama jer nerastvorene supstance mogu da se skupljaju na spojevima ili u glavi pumpe onemogućavajući rad i, takođe, jer je u protočnom reaktoru u svakom trenutku u kontaktu sa enzimom samo rastvorena količina supstrata, tako da je samo ona na raspolaganju za reagovanje. Koncentracija L-askorbinske kiseline je u skladu sa tim odabrana tako da je sva uneta količina u potpunosti rastvorena u reakcionom medijumu i bila je konstantna – 50 mM u svim eksperimentima osim u toku kinetičke studije.



Slika 4.41. Uticaj rastvarača na sintezu L-askorbil-oleata. Reakcije su izvođene u šaržnom sistemu na 60 °C sa 0,05 M vitamina C, 0,5 M oleinske kiseline i 0,2 % (w/v) enzima.

Neki od optimuma najbitnijih reakcionih parametara dobijenih u prethodnom delu studije primenjeni su i u izmenjenim uslovima (drugi katalizator i rastvarač) – temperatura i

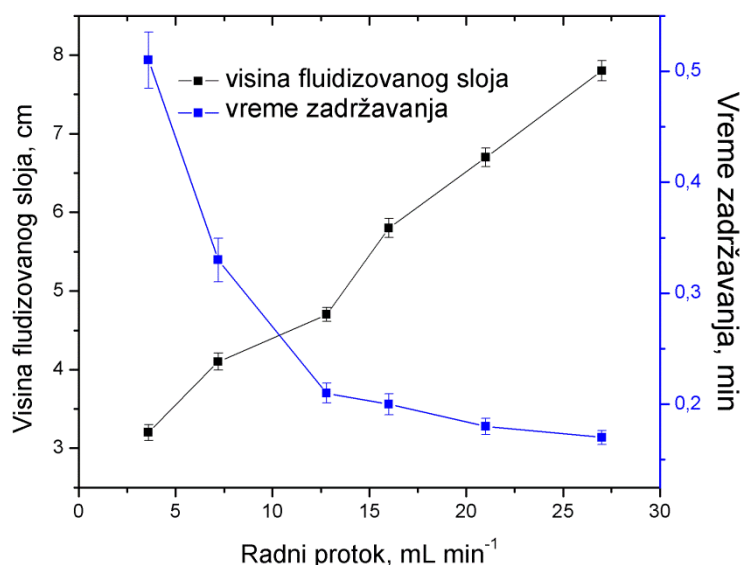
količina vode, dok je uticaj onih za koje se očekivala moguća promena optimuma – koncentracija enzima i molski odnos supstrata, ponovo ispitivan. Prethodno optimizovana temperatura – 60 °C, u protočnom sistemu je održavana zagrevanjem reakcione smeše na magnetnoj mešalici sa termostatom i propuštanjem vode predgrejane na 60 °C kroz plašt reaktora. Dodatni operativni parametri: radni protok (i odgovarajuća visina fluidizovanog sloja tj. vreme zadržavanja) i efekat dodavanja molekulskih sita, ispitani su u protočnom sistemu.



Slika 4.42. Uticaj molskog odnosa supstrata na prinos estera. Reakcije su izvođene u šaržnom sistemu u *t*-butanolu na 60 °C sa 0,05 M vitamina C, pri različitim molskim odnosima supstrata i sa 0,2 %(w/v) enzima.

U cilju određivanja optimalnog molskog odnosa supstrata, varirana je količina oleinske kiseline unete u reakcionu smešu. Već je pokazano da višak oleinske kiseline pozitivno utiče na ravnotežni stepen konverzije, pa je i opseg u kome je ovaj parametar variran – 1:4 do 1:14, odabran u skladu sa tim. Na slici 4.42. su prikazani reakcioni tokovi pri pet ispitivanih molskih odnosa iz kojih se može zaključiti da se pri koncentraciji vitamina C od 50 mM najveće početne brzine i krajnji prinosi proizvoda ostvaruju pri osmostrukom višku oleinske kiseline. Primetno je da je optimalni molski odnos nešto niži nego pri istoj koncentraciji vitamina C kada je reakcija izvođena u acetonu sa Novozym[®]-om 435. Moguće je da između izrazito hidrofobne površine nosača Purolite[®] MN102 i takođe hidrofobne oleinske kiseline postoje privlačne sile koje i pri nižoj koncentraciji ovog supstrata obezbeđuju dovoljnu dostupnu količinu u okolini nosača pa se u skladu sa tim

menjaju uslovi pri kojima se ostvaruje maksimalni ravnotežni stepen konverzije. Na taj način je zapravo moljski odnos supstrata tj. višak oleinske kiseline u mikrookolini nosača znatno veći nego u ostatku reakcionog medijuma. Nakon dostizanja maksimalnog prinosa pri osmostrukom višku oleinske kiseline dolazi do pada pri daljem povećavanju njene koncentracije. Moguće je da je u ovom slučaju ukupna hidrofobnost reakcione smeše koja je pri istoj koncentraciji oleinske kiseline veća u *t*-butanolu nego u acetonu bila ključni faktor za pad prinosa pri previsokim moljskim odnosima s obzirom na to da je pristup hidrofilne L-askorbinske kiseline aktivnom centru enzima u takvim uslovima otežan.



Slika 4.43. Uticaj radnog protoka na visinu fluidizovanog sloja i vreme zadržavanja.

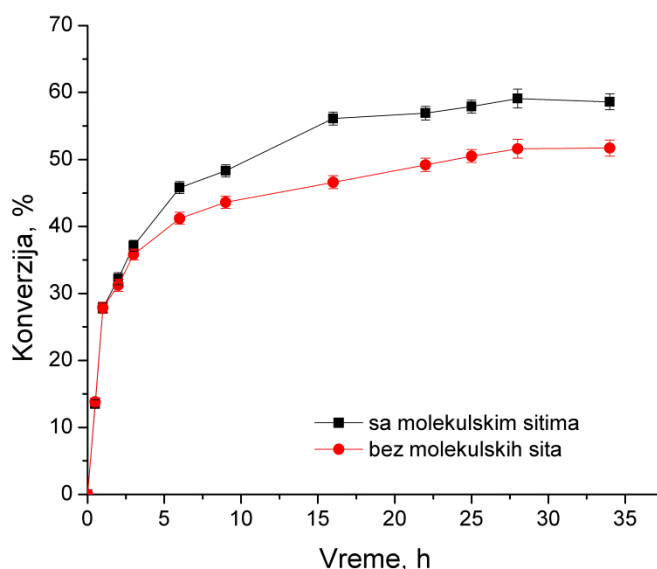
Tabela 4.11. Uticaj radnog protoka na početnu brzinu reakcije.

Radni protok, mL min ⁻¹	Početna brzina, mM h ⁻¹
3,6	8,63±0,03
4,2	8,56±0,02
7,2	8,51±0,1
12,8	8,75±0,07
16	8,62±0,09
21	8,79±0,06
27	8,45±0,08

Reakcije su izvođene u *t*-butanolu sa 40 mL reakcione smeše na 60 °C, sa 8,9 IU mL⁻¹ enzima, 50 mM vitamina C i 0,4 M oleinske kiseline.

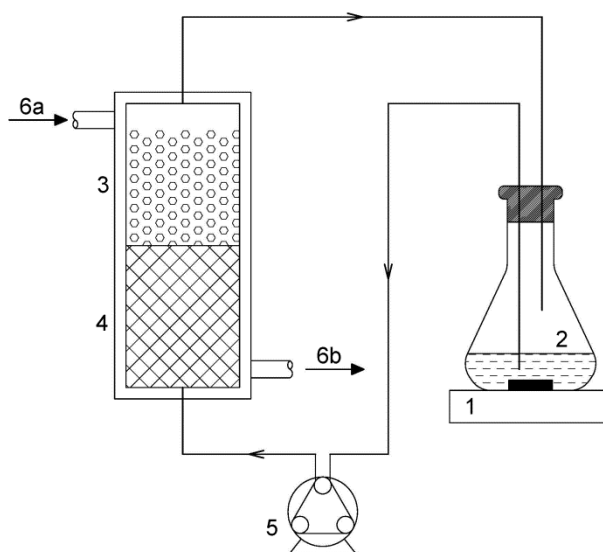
Zatim je u protočnom reaktorskom sistemu određen optimalni režim rada variranjem protoka napojne smeše kroz sistem, i to u opsegu 3,6-27 mL min⁻¹. Treba napomenuti da je najniži primenjeni protok bio odabran u skladu sa karakteristikama pumpe. Na slici 4.43. je prikazan uticaj radnog protoka na vreme zadržavanja i visinu fluidizovanog sloja.

Očigledno je i očekivano da se pri najmanjem protoku ostvaruje najmanja visina fluidizovanog sloja – 3,2 cm, dok je odgovarajuće vreme zadržavanja najveće – 0,51 min. Sa povećanjem protoka reakcione smeše u ispitivanom opsegu visina fluidizovanog sloja konstantno raste, dok vreme zadržavanja, iako se uočava kontinuirani pad, pokazuje drugačiji oblik zavisnosti i pri protocima većim od 12,8 mL min⁻¹ postaje gotovo konstantan. Treba imati na umu da, utičući na visinu fluidizovanog sloja i vreme kontakta reaktanata sa katalizatorom, radni protok dvojako utiče na reakcioni tok. Naime, pri isuviše niskim protocima, iako je vreme reagovanja veće, postoji mogućnost pojave ograničenja u prenosu mase zbog veće debljine difuzionog sloja koji okružuje imobilisanu lipazu, što dovodi do smanjenja brzine reakcije u odnosu na sisteme sa slobodnim enzimom. Sa druge strane, kada je protok napojne smeše previsok, vreme kontakta supstrata sa imobilisanom lipazom može biti suviše kratko, a može doći i do inaktivacije enzima uzrokovanog smicajnim silama, dok dalje povećanje protoka iznad brzine odnošenja dovodi do narušavanja fluidizovanog sloja i odnošenja imobilisanog enzima iz reaktora. Početne brzine reakcije ostvarene pri različitim protocima prikazane su u tabeli 4.11. iz koje se može videti da je ostvarena brzina nezavisna od protoka. ANOVA analiza je takođe pokazala da u ispitivanom opsegu protok napojne smeše nema signifikantan uticaj na brzinu esterifikacije ($p=0,082$).



Slika 4.44. Reakcioni tok sinteze askorbil-oleata u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem u sistemu bez molekulskih sita i sa sitima. Reakcije su izvođene u *t*-butanolu sa 40 mL smeše na 60 °C, sa 0,05 M vitamina C, 0,4 M oleinske kiseline, količinom enzima od 9,5 IU mL⁻¹ smeše i 25 mg mL⁻¹ molekulskih sita.

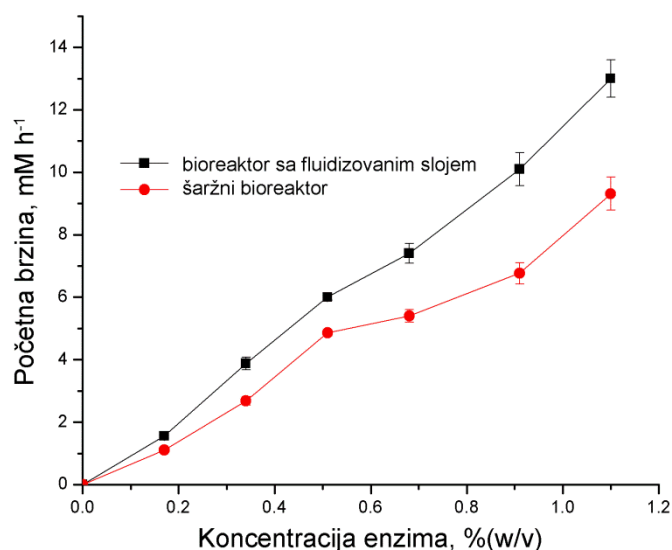
Takođe u protočnom sistemu, ispitan je uticaj dodavanja molekulkih sita u cilju adsorbovanja viška vode iz reakcione smeše. U ovom slučaju nije bilo moguće varirati vreme dodavanja molekulkih sita, već je sama konfiguracija sistema bila donekle izmenjena tako da je bila sastavljena iz dve redno vezane kolone (donji deo reaktora, fiksiran sa obe strane, je bio napakovan sitima, dok su iznad njega bile napakovane čestice biokatalizatora koje su slobodno mogle da fluidizuju). Na osnovu rezultata prikazanih na slici 4.44. može se zaključiti da je efekat dodavanja adsorbensa veoma sličan uticaju opisanom u šaržnom sistemu sa komercijalnim enzimom. Efekat dodavanja sita je u prvih nekoliko sati, dok koncentracija formirane vode u sistemu još uvek nije dovoljno visoka da u većoj meri favorizuje hidrolizu, zanemarljiv, dok u daljem toku reakcije dovodi do produžavanja perioda u kome se estar stvara brzinom bliskoj početnoj. Kao krajnji rezultat, u sistemu sa molekulkim sitima se u kraćem vremenu ostvaruju isti prinosi, odnosno u istom vremenu nešto viši prinosi, pa su dalji eksperimenti bili izvođeni sa sitima. Šema konfiguracije koja je primenjivana u daljim ispitivanjima prikazana je na slici 4.45.



Slika 4.45. Šema konfiguracije sistema sa fluidizovanim slojem i molekulkim sitima: 1 – magnetna mešalica sa termostatom, 2 – erlenmajer sa reakcionom smešom i magnetom, 3 – fluidizovani sloj čestica, 4 – pakovani sloj molekulkih sita, 5 – peristaltička pumpa, 6 – duplikator sa vodom (ulaz (6a) i izlaz (6b)).

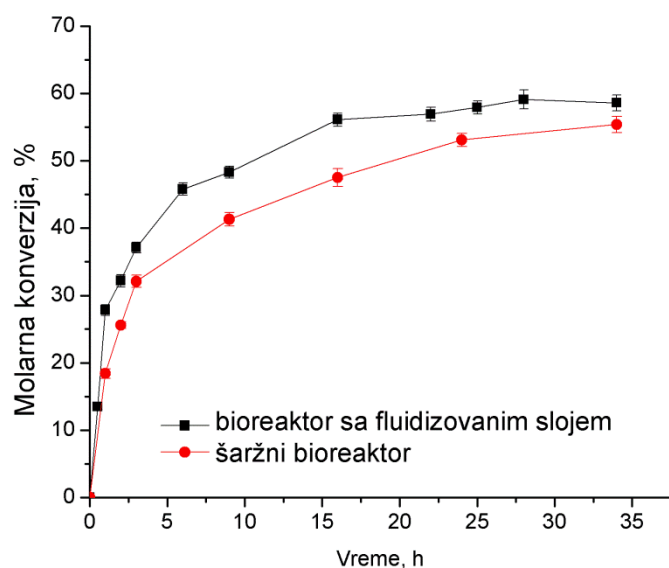
Dalji eksperimenti bili su fokusirani na ispitivanje uticaja koncentracije enzima na ostvarene početne brzine esterifikacije. Sadržaj enzima variran je u opsegu 0,17-1,1

%(w/v), a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.46. Kao što se sa slike može uočiti, u oba sistema – šaržnom i protočnom početna brzina esterifikacije u celom posmatranom opsegu raste sa povećanjem koncentracije enzima. Sa druge strane, primenom ANOVA analize utvrđeno je da odgovarajuće produktivnosti ($\text{mmol g}^{-1}\text{enzima h}^{-1}$) u oba reaktora ne zavise statistički značajno od koncentracije biokatalizatora ($p=0,809$ u protočnom i $p=0,794$ u šaržnom sistemu), pa konačni izbor koncentracije enzima svakako treba da bude kompromis između cene utrošene imobilisane lipaze i brzine kojom se pri takvim uslovima postižu zadovoljavajuće koncentracije proizvoda u reakcionoj smeši. Takođe je evidentno da se u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem ostvaruju nešto više početne brzine, u proseku oko 40 % u odnosu na šaržni sistem. Ovakvi rezultati nisu neočekivani s obzirom na to da je u literaturi već prijavljeno da se povećanje brzine esterifikacije katalizovane imobilisanim lipazama može ostvariti upravo semi-kontinualnim izvođenjem reakcije u reaktorima sa fluidizovanim slojem (255, 256).



Slika 4.46. Uticaj koncentracije enzima na početnu brzinu reakcije u protočnom i šaržnom sistemu. Reakcije su izvođene u 5 mL (šaržni) i 40 mL (fluidizovani) smeše u *t*-butanolu na 60 °C, sa 0,05 M vitamina C, 0,4 M oleinske kiseline i 25 mg mL⁻¹ molekulskih sita.

Kada je pri koncentraciji enzima pri kojoj je ostvarena najveća brzina praćen reakcioni tok u dužem vremenskom periodu (do 34 h) uočeno je da se, pored većih početnih brzina, u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem ostvaruje i nešto viši stepen konverzije, ali da se pri dovoljno dugom vremenu reagovanja dve krive praktično spajaju (slika 4.47.).



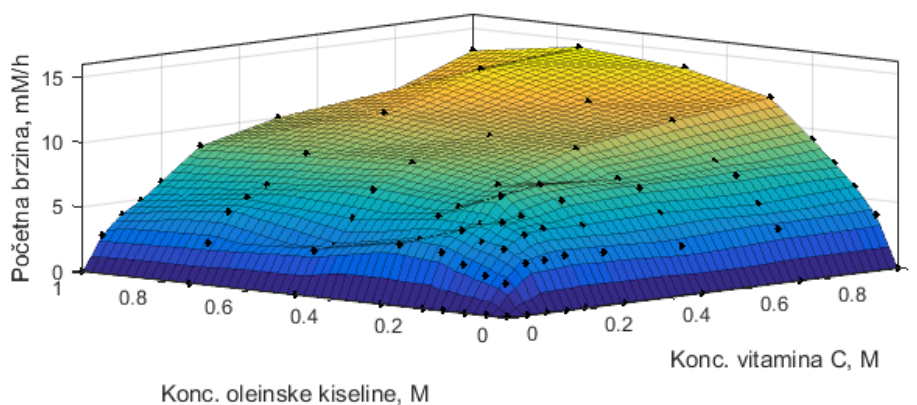
Slika 4.47. Reakcioni tok u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom bioreaktoru. Reakcije su izvođene u 5 mL (šaržni) i 40 mL (fluidizovani) smeše u *t*-butanolu na 60 °C, sa 0,05 M vitamina C, 0,4 M oleinske kiseline, pri koncentraciji enzima od 9,5 IU mL⁻¹ i sa 25 mg mL⁻¹ molekulskih sita.

4.6.2. Kinetička studija

S obzirom na to da je reakcija izvođena u dva reaktorska sistema potpuno različitih konfiguracija, bilo je značajno okarakterisati ih i sa aspekta hidrodinamike. Da bi bilo potvrđeno da je pri odabranim operativnim uslovima uticaj otpora prenosu mase zanemarljiv i da je proces kinetički kontrolisan, urađen je i hidrodinamički proračun. U cilju određivanja vrednosti kinetičke konstante V_m koja je neophodna za ovaj proračun, na način opisan u poglavlju 4.4. urađena je kinetička studija za reakciju u *t*-butanolu katalizovanu lipazom CAL B imobilisanom na Purolite[®] MN102. Koncentracije supstrata su varirane u opsegu 0,05-1 M i eksperimentalni plan se sastojao od 64 tačke, kao i u prethodno pomenutom delu studije. Uneta aktivnost lipaze (oko 4,5 IU mL⁻¹) bila je oko 2 puta niža od one primenjene u reakciji katalizovanoj Novozym[®]-om 435, s obzirom na to da su u *t*-butanolu sa oba enzima postizane veće brzine nego u acetonu, a da bi performanse imobilizata i dobijene vrednosti konstanti mogli biti upoređeni sa komercijalnim preparatom. U protočnom sistemu nije bilo moguće varirati koncentracije supstrata u tako širokom opsegu, s obzirom na limitiranu rastvorljivost vitamina C, kao što je već obrazloženo. Iz tog razloga je pod pretpostavkom da je mehanizam reakcije koja se odvija pod istim uslovima u dva primenjena sistema isti, model dobijen u šaržnom sistemu korišćen za fitovanje eksperimentalnih podataka dobijenih u reaktoru sa fluidizovanim

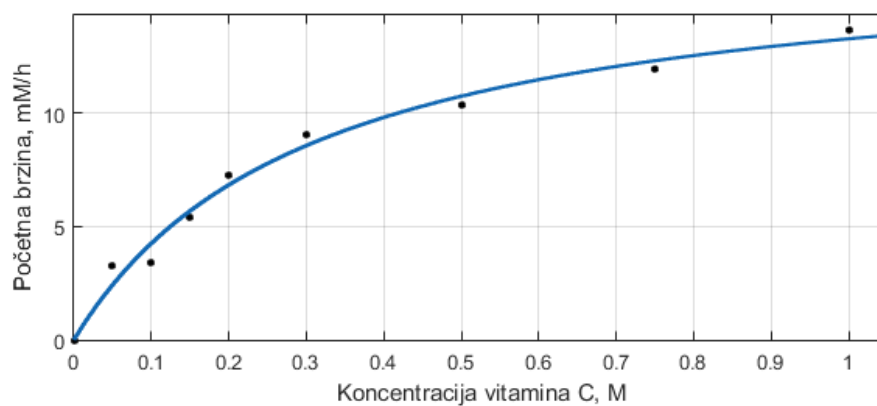
slojem u cilju izračunavanja konstante V_m . Dobijene vrednosti nadalje su korišćene u cilju ispitivanja postojanja otpora prenosu mase u oba reakciona sistema, odnosno potvrđivanju pretpostavke da je pod odabranim reakcionim uslovima reakcija kinetički kontrolisana.

Početne brzine reakcije esterifikacije pri različitim koncentracijama vitamina C i oleinske kiseline predstavljene su 3D dijagramom (slika 4.48.)

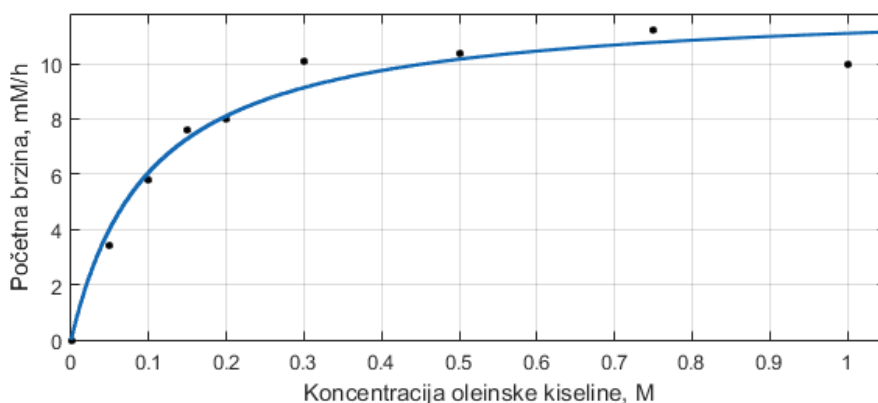


Slika 4.48. Uticaj koncentracije vitamina C i oleinske kiseline na početnu brzinu reakcije.

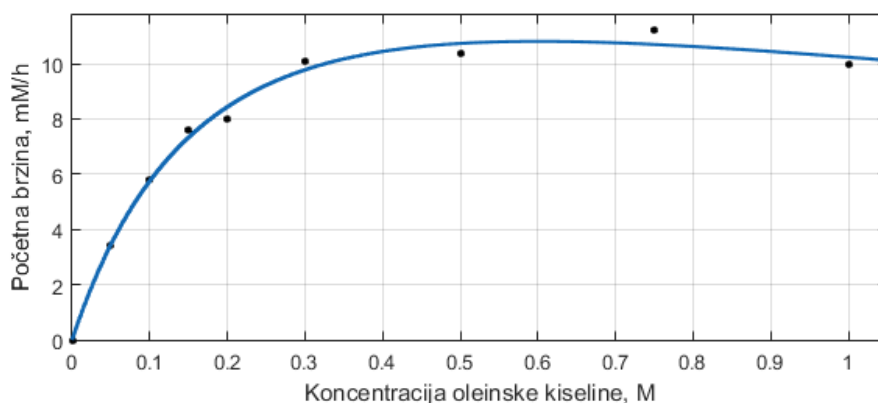
Na osnovu tipičnih zavisnosti početne brzine esterifikacije od koncentracije jednog supstrata pri fiksiranoj koncentraciji drugog je na način opisan u poglavlju 4.4. potvrđeno da se uticaj vitamina C može opisati tipičnom Mihaelis-Mentenovom kinetikom (slika 4.49.a), dok je kod uticaja oleinske kiseline evidentna pojava pada brzine pri visokim koncentracijama što ukazuje na inhibiciju ovim supstratom (slika 4.49.b i 4.49.c). Kada se ovi rezultati uporede sa reakcijom katalizovanom komercijalnim preparatom u acetonu, evidentna je razlika s obzirom na to je u tom sistemu postojala inhibicija viškom vitamina C.



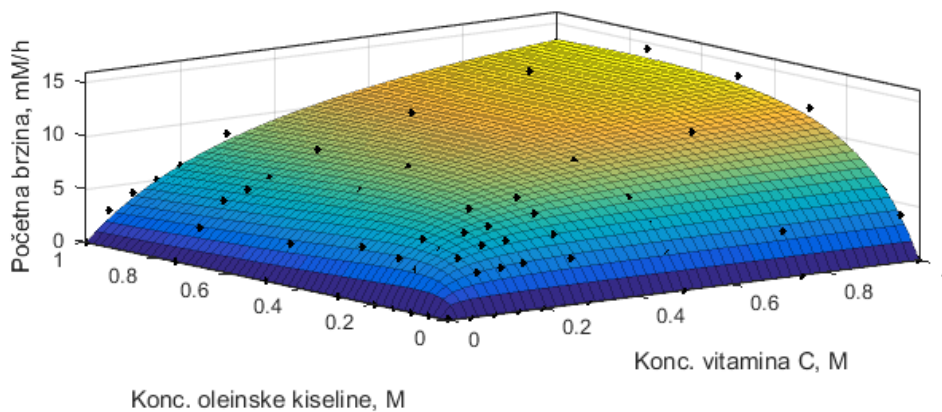
(a)



(b)



(c)



(d)

Slika 4.49. Tipične krive kinetičkog modela bez uključene inhibicije pri fiksiranoj koncentraciji jednog supstrata: (a) 0,5 M oleinske kiseline i (b) 0,5 M vitamina C i prikaz modela sa uključenom inhibicijom oleinskom kiselinom: (c) tipična kriva pri fiksiranoj koncentraciji vitamina C na 0,5 M. i (d) 3D prikaz.

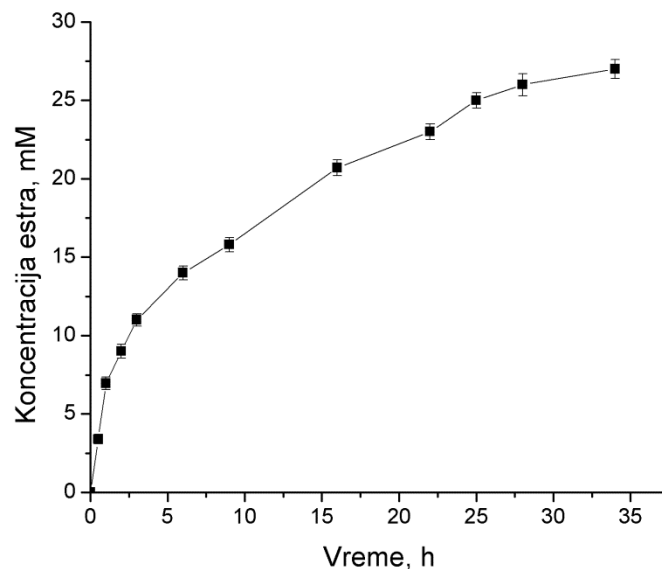
Eksperimentalni rezultati su fitovani ping-pong bi-bi modelom bez inhibicije i sa uključenom inhibicijom kiselinom. Bolje poklapanje dobijeno je primenom modela sa uključenim inhibitornim dejstvom oleinske kiseline ($R^2=0,9817$), što se može primetiti i na

slikama 4.49.b i 4.49.c, pa je ovaj kinetički model usvojen. 3D prikaz ovog modela dat je na slici 4.49.d. Dobijene vrednosti kinetičkih parametara prikazane su u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Vrednosti kinetičkih konstanti modela.

Kinetička konstanta	V_m (mmol h ⁻¹ L ⁻¹)	K_{rv} (mol L ⁻¹)	K_{ok} (mol L ⁻¹)	$K_{i,ok}$ (mol L ⁻¹)	$K_{s,rv}$ (L h ⁻¹ g ⁻¹)	$K_{s,ok}$ (L h ⁻¹ g ⁻¹)
Vrednost	24,6	0,1517	0,2741	0,3821	0,0180	0,9960

Izostanak inhibicije vitaminom C je jasan kada se analizira vrednost konstante specifičnosti za ovaj supstrat. Vrednost ove konstante za L-askorbinsku kiselinu je znatno niža nego u sistemu sa komercijalnim biokatalizatorom i acetonom kao rastvaračem (skoro 11 puta), dok je konstanta specifičnosti prema oleinskoj kiselini takođe promenjena (oko 40 % veća). Iz ovih vrednosti jasno je da je afinitet lipaze imobilisane na nosač velike hidrofobnosti prema izrazito polarnom vitaminu C kao supstratu drastično opao, kao i da je afinitet prema hidrofobnom supstratu nešto veći. Iz tog razloga formiranje neaktivnog kompleksa enzima sa acil-akceptorom koje bi dovelo do inhibicije lipaze pri visokim koncentracijama više nije bilo verovatno. Što se tiče uočene inhibicije kiselinom, ova pojava se u literaturi uglavnom objašnjava formiranjem neaktivne forme između acil-enzim kompleksa i drugog molekula donora acil-ostatka (144). Visoka vrednost ove konstante u poređenju sa podacima iz studije u kojoj su Jadav i Lati sintetisali citronelol-laurat u *n*-heptanu ukazuje na činjenicu da oleinska kiselina nije jak inhibitor lipaze (144).



Sika 4.50. Profil koncentracije askorbil-oleata u bioreктору sa fluidizovanim slojem u toku vremena. Reakcija je izvođena sa 40 mL reakcione smeše u *t*-butanolu na 60 °C, sa 0,05 M vitamina

C, 0,4 M oleinske kiseline, pri koncentraciji enzima od 4,5 IU mL⁻¹ i sa 25 mg mL⁻¹ molekulskih sita.

U bioreaktoru sa fluidizovanim slojem je na osnovu pretpostavke da se pod identičnim reakcionim uslovima ista reakcija u dva sistema odvija prema istom mehanizmu određena vrednost konstante V_m na osnovu početne brzine izračunate iz linearnog dela $C-t$ krive sa slike 4.50., koja je korišćena u daljem proračunu. Dobijena je nešto veća vrednost (oko 43 %) nego u šaržnom bioreaktoru – 35,14 mmol h⁻¹ L⁻¹, što je u skladu sa zapažanjima iz prethodnog dela studije u kome su praćeni reakcioni tok i zavisnost početnih brzina esterifikacije od koncentracije enzima u dva sistema.

4.6.3. Poređenje prenosa mase u dva sistema, šaržnom i reaktoru sa fluidizovanim slojem

Efekat otpora spoljašnjem prenosu mase na brzinu reakcija katalizovanih imobilisanim enzimima uobičajeno se određuje na osnovu vrednosti Damklerovog kriterijuma (Da):

$$Da = \frac{V_m''}{kc}$$

gde je V_m'' (mol m⁻² s⁻¹) maksimalna brzina reakcije po jedinici površine biokatalizatora, k (m s⁻¹) koeficijent prenosa mase tečno-čvrsto i C (mol m⁻³) koncentracija supstrata u rastvoru. Tako je za vrednosti $Da \ll 1$ efekat otpora prenosu mase zanemarljiv, i obratno, kada je $Da \gg 1$ proces se usled difuzionih limitacija ne može smatrati kinetički kontrolisanim. U slučaju da je $Da \approx 1$ brzina reakcije i brzina kojom supstrati dolaze do aktivnog centra su približno jednake.

V_m'' se izračunava na sledeći način:

$$V_m'' = \frac{V_m V_{sm}}{A_b}$$

pri čemu je V_m (mol m⁻³ s⁻¹) maksimalna vrednost početne brzine reakcije u slučaju da je ona kinetički kontrolisana, V_{sm} (m³) zapremina reakcione smeše, dok je A_b (m²) površina biokatalizatora. Površina biokatalizatora se u slučaju spoljašnjeg prenosa mase (bez pora) može izračunati kao proizvod specifične spoljašnje površine sfera (SP , m² g⁻¹ biokatalizatora) i mase biokatalizatora.

Pored maksimalne brzine reakcije po jedinici površine biokatalizatora, neophodno je izračunati i koeficijent prenosa mase kako bi bilo moguće proceniti da li je pod odabranim operativnim uslovima u nekom reakcionom sistemu odigravanje procesa kinetički ili

difuziono kontrolisano. Da bi bilo moguće izračunavanje koeficijenta prenosa mase tj. Šmitovog broja koji je neophodan za proračun, potrebno je odrediti difuzivnost supstrata (D , $m^2 s^{-1}$) u rastvaraču, za šta se koristi sledeća jednačina (257):

$$D = \frac{1,173 \cdot 10^{-16} (\varphi M_r)^{0,5} T}{\mu V_{m,s}^{0,6}}$$

U ovom izrazu figurišu sledeće veličine:

φ - faktor asocijativnosti rastvarača

M_r ($g mol^{-1}$) - molarna masa rastvarača

T (K) - temperatura reakcije

μ (Pa s) - dinamički viskozitet rastvarača

$V_{m,s}$ ($dm^3 mol^{-1}$) - molarna zapremina supstrata na temperaturi ključanja

Molarna zapremina supstance opšte formule $C_x H_y O_z$ na temperaturi ključanja se izračunava na sledeći način:

$$V_{m,s} = xV_{m,C} + yV_{m,H} + zV_{m,O}$$

gde su $V_{m,C} = 14,8 \cdot 10^{-3} dm^3 mol^{-1}$, $V_{m,H} = 3,7 \cdot 10^{-3} dm^3 mol^{-1}$ i $V_{m,O} = 7,4 \cdot 10^{-3} dm^3 mol^{-1}$ molarne zapremine ugljenika, vodonika i kiseonika na temperaturama ključanja.

Za bioreaktor sa fluidizovanim slojem biće primenjena sledeća kriterijalna jednačina u cilju izračunavanja koeficijenta prenosa mase:

$$Sh = \frac{k d_\xi}{D}$$

u kojoj Sh predstavlja Šervudov kriterijum, a d_ξ (m) prečnik čestice biokatalizatora. Sh će biti izračunat na osnovu sledećih jednačina (255):

$$Sh = 0,23 Ar^{1/3} Sc^{0,4}$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D}$$

$$Ar = \frac{g d_\xi^3 \rho (\rho_\xi - \rho)}{\mu^2}$$

u kojima je Sc Šmitov broj, a Ar Arhimedov (Archimedes) broj.

Koeficijent prenosa mase u šaržnom bioreaktoru sa mešanjem biće izračunat na osnovu sledeće jednačine (253):

$$k = 0,13 \frac{\left(\frac{P}{V_{sm}} \mu\right)^{0,25}}{Sc^{2/3}}$$

gde su V_{sm} i μ prethodno definisani, Sc se izračunava na isti način kao i u protočnom sistemu, a ρ (kg m^{-3}) i P (W) su redom gustina tečne faze i snaga mešanja. Gustina smeše se izračunava na osnovu masenih udela (x_i) i gustina (ρ_i) komponentata od kojih je sastavljena:

$$\rho = \sum x_i \rho_i$$

dok se snaga mešanja u erlenmajeru na orbitalnoj mešalici, kao što je već prikazano u teorijskom delu, računa na osnovu vrednosti modifikovanog faktora snage (Ne') kao

$$P = Ne' \rho n^3 d^4 V_{sm}^{1/3}$$

gde je

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0,6} + 1,5Re^{-0,2} \quad \text{i} \quad Re = \frac{\rho n d^2}{\mu}$$

U prethodnim jednačinama n (s^{-1}) predstavlja broj obrtaja mešalice, d (m) maksimalnu vrednost unutrašnjeg prečnika bioreaktora, dok su ostale veličine prethodno definisane.

Vrednosti svih konstanti i izračunate vrednosti hidrodinamičkih parametara prikazane su u tabelama 4.13. i 4.14.

Tabela 4.13. Vrednosti konstanti potrebnih za proračun.

$V_m 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)	6,83 (ŠB) 9,76 (FB)	M_r (g mol^{-1})	74,12	ρ (kg m^{-3})	769
$V_{sm} 10^5$ (m^3)	0,5 (ŠB) 4 (FB)	T (K)	333,15	ρ_i (kg m^{-3})	1070
SP ($\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$)	0,02	$\mu 10^3$ (Pa s)	1,008	d (m)	0,065 (ŠB) 0,009 (FB)
m (g)	0,025 (ŠB) 0,2 (FB)	C_{VC} (mol m^{-3})	50	$v 10^3$ ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}$)	1,42 (ŠB) 1,95 (FB)
$A_b 10^3$ (m^2)	0,5 (ŠB) 4 (FB)	C_{OK} (mol m^{-3})	400	ε_i	0,529
φ	1	$d_i 10^4$ (m)	5,35	t	1,48
$\dot{V} 10^8$ ($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$)	7	h (m)	0,034	$V 10^6$ (m^3)	2,16

VC – vitamin C; OK – oleinska kiselina; ŠB – šaržni bioreaktor; FB – bioreaktor sa fluidizovanim slojem.

Tabela 4.14. Izračunate vrednosti parametara.

$V_m'' 10^9$ ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,95 (ŠB) 2,79 (FB)	Sc_{VC}	1322,7	Re	10743
$V_{m,VC}$ ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	0,163	Sc_{OK}	2291,6	Ne'	0,336
$V_{m,OK}$ ($\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$)	0,407	Ar	342,22	$10^3 P$ (W)	2,93
$D_{VC} 10^{10}$ ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	9,91	Sh_{VC}	28,46	$D_{ef,VC} 10^{10}$ ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	3,54
$D_{OK} 10^{10}$ ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	5,72	Sh_{OK}	35,46	$D_{ef,OK} 10^{10}$ ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)	2,04

ŠB – šaržni bioreaktor; FB – bioreaktor sa fluidizovanim slojem; VC – vitamin C; OK – oleinska kiselina.

Na osnovu vrednosti Damklerovog broja prikazanih u tabeli 4.15. može se zaključiti da za oba supstrata i oba reaktorska sistema nema otpora spoljašnjem prenosu mase, s obzirom na to da je u svim slučajevima $Da \ll 1$. Efekat proticanja fluida u semi-kontinualnom sistemu i mešanja u šaržnom bioreaktoru još bolje se može sagledati kada se uzme u obzir činjenica da bi u slučaju kada se prenos mase odvija isključivo putem prirodne konvekcije ($Sh=2$) brzina prenosa mase bila mnogo manja i, samim tim, bliža brzini reakcije. Ovakav pristup, koji predviđa samo postojanje prirodne konvekcije, je ranije predložen i primenjen od strane nekoliko autora (258, 259). Međutim, Damklerov broj je za $Sh=2$ bio za oko jedan red veličine veći (14 i 18 puta u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem i 9 i 11 puta u šaržnom bioreaktoru za vitamin C i oleinsku kiselinu, redom) nego u slučaju kada je u proračunu u obzir uzeta i prinudna konvekcija. Odabrani radni uslovi se stoga mogu smatrati dovoljnim da omoguće brzo dovođenje supstrata do aktivnih centara biokatalizatora i tako isključe efekat otpora u spoljašnjem prenosu mase na brzinu kojom se odigrava reakcija.

Tabela 4.15. Vrednosti Damklerovog broja i Tielovog modula u šaržnom bioreaktoru i bioreaktoru sa fluidizovanim slojem.

Šaržni bioreaktor		Bioreaktor sa fluidizovanim slojem	
Da_{10^2}, VC	3,98	Da_{10^2}, VC	3,70
Da_{10^3}, OK	7,18	Da_{10^3}, OK	6,44
Φ_{10^4}, VC	8,76	Φ_{10^3}, VC	5,88
Φ_{10^4}, OK	1,90	Φ_{10^4}, OK	1,38

VC – vitamin C; OK – oleinska kiselina.

Kada je utvrđeno da otpora spoljašnjem prenosu mase nema, analiziran je prenos mase u porama biokatalizatora. Da bi se difuzione limitacije mogle smatrati zanemarljivim, u ovom slučaju moraju biti zadovoljena dva kriterijuma. Faktor efektivnosti (η) koji predstavlja odnos ostvarene brzine reakcije i brzine u sistemu bez limitacija mora biti približno jednak jedinici, što u oba ispitivana sistema jeste slučaj, dok vrednost Tielovog modula mora biti manja od 0,3. Tielov modul se izračunava korišćenjem efektivne difuzivnosti (D_{ef}) na sledeći način (260):

$$\Phi = \frac{v}{D_{ef}c} \left(\frac{d_c}{6} \right)^2$$

Efektivna difuzivnost uzima u obzir da se difuzija supstrata u porama biokatalizatora ne može odvijati na isti način kao u tečnoj fazi koja ih okružuje i ona predstavlja proizvod difuzivnosti i faktora tortuoznosti (τ):

$$D_{ef} = D\tau = D \frac{\varepsilon_c}{t}$$

gde je ε_c poroznost čestica, dok je t tortuoznost ili uvijenost unutrašnjih pora (tortuosity). Tortuoznost je određena na osnovu korelacije predložene na osnovu Bolcmanovog modela rešetki (LBM – Lattice Boltzmann Model) (261).

Na osnovu izračunatih vrednosti Tielovog modula prikazanih u tabeli 4.15. može se zaključiti da se unutrašnji prenos mase (oba supstrata) u oba sistema odvija neometano pri odabranim radnim uslovima, pa se ovakvi procesni parametri mogu primenjivati i u daljim ispitivanjima.

Često operativni uslovi koji omogućavaju efikasan prenos mase u reakcionom sistemu dovode do inaktivacije osetljivih biokatalizatora kao što su enzimi i ćelije ili njihove desorpcije sa nosača, pa se izračunavanjem tangencijalnog napona (τ , Pa) može ostvariti uvid u intenzitet smicajnih sila koje deluju na čestice u sistemu i njihovo potencijalno delovanje na desorpciju i/ili gubitak katalitičke aktivnosti usled narušavanja strukture. Iako je jedna od prednosti korišćenja imobilisanih enzima to što je veliki deo katalizatora vezan u dubljim slojevima pora u kojima je zaštićen od delovanja ovih sila, ipak je jedan deo vezan za spoljašnjost čestice nosača i izložen je uticajima napona smicanja. Iz tog razloga je sledeći deo proračuna bio usmeren upravo na određivanje tangencijalnih napona u dva sistema.

U bioreaktoru sa fluidizovanim slojem su prvo izračunati hidraulički dijametar intersticijalnih praznina u sloju čestica (Dh , m) i brzina fluida (U , m s⁻¹), s obzirom na to da su ovi paramtri neophodni za određivanje Rejnoldsovog broja na osnovu koga se utvrđuje režim strujanja i bira kriterijalna jednačina za izračunavanje smicajnog napona.

Brzina proticanja fluida (U , m s⁻¹) je određena na osnovu površinske brzine (U_p , m s⁻¹) i poroznosti fluidizovanog sloja (ε) na sledeći način:

$$U = \frac{U_p}{\varepsilon}$$

pri čemu je

$$\varepsilon = \frac{V - \frac{m}{\rho_c}(1 - \varepsilon_c)}{V}, \quad V = \frac{d^2}{4} \pi h$$

dok je

$$U_p = \frac{\dot{V}}{d^2/4 \pi}$$

Hidraulički dijametar intersticijalnih praznina se određuje iz jednačine

$$Dh = \frac{1}{3} \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \frac{d}{M}$$

u kojoj je M korekcionni faktor kojim se utvrđuje uticaj zidova kolone na veličinu Dh (262).

Ovaj faktor se može izračunati na sledeći način:

$$M = 1 + \frac{2}{3} \frac{1}{1 - \varepsilon} \frac{d_{\xi}}{d}$$

Kada su izračunati Dh i U , određena je vrednost Rejnoldsovog broja (263):

$$Re = \frac{U Dh \rho}{\mu} = 0,16 < 1$$

S obzirom na to da je vrednost Re manja od 1, može se zaključiti da je režim proticanja fluida u bioreaktoru laminaran. U tom slučaju se napon smicanja izračunava iz naredne jednačine:

$$\tau = \frac{8 \mu U}{Dh}$$

iz koje se dobija vrednost od $5 \cdot 10^{-2}$ Pa.

U šaržnom bioreaktoru se na osnovu već izračunatog Rejnoldsovog broja zaključuje da je režim strujanja fluida turbulentan ($Re=10743 > 1000$), pa se može primeniti Kolmogorov model izotropne turbulencije. Parametri neophodni za određivanje smicajnih napona su prosečna brzina disipacije kinetičke energije po jedinici mase ($\langle \varepsilon \rangle$, $J \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$) i dimenzije mikro-vrtloga (l , m) čija se turbulentna energija rasipa pri sudaru sa česticama:

$$\langle \varepsilon \rangle = \frac{P}{\rho V}, \quad l = \left(\frac{\mu^3}{\rho^3 \langle \varepsilon \rangle} \right)^{1/4}$$

Ukoliko je $3 < d_{\xi} < 12l$, smatra se da je sistem u podoblasti disipacije u okviru turbulentne oblasti. S obzirom na to da je $d_{\xi} \approx 12l$, što predstavlja prelaz između oblasti disipacije i inercijalne oblasti, može se primeniti sledeća jednačina (264):

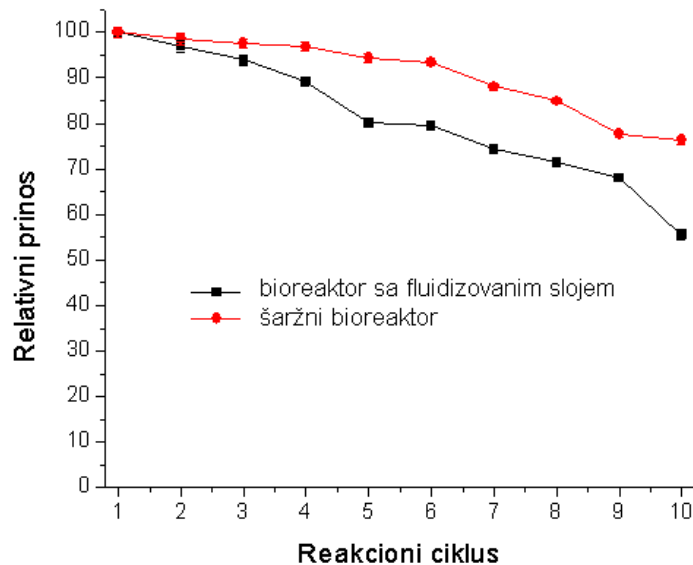
$$\tau = 2,46 \rho (\langle \varepsilon \rangle d)^{2/3}$$

na osnovu koje se dobija vrednost smicajnog napona od 10,46 Pa.

Poređenjem vrednosti tangencijalnih napona izračunatih u dva ispitivana reaktorska sistema uočava se da je u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem, u kome je ostvaren laminarni režim proticanja, delovanje smicajnih sila za 2-3 reda veličine manje nego u šaržnom bioreaktoru, u kome je režim strujanja bio turbulentan. Ove vrednosti će biti uzete u obzir pri ispitivanju uticaja napona smicanja na inaktivaciju enzima pri njegovom korišćenju u konsektivnim reakcionim ciklusima.

4.6.4. Poređenje operativne stabilnosti imobilisane lipaze u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem i šaržnom bioreaktoru

Operativna stabilnost imobilisanog biokatalizatora je ispitana njegovom upotrebom u konsektivnim reakcionim ciklusima u oba reaktorska sistema. U reaktoru sa fluidizovanim slojem, ispitivanje je vršeno pri protoku $4,2 \text{ mL min}^{-1}$, koncentraciji imobilisanog enzima 5 mg mL^{-1} , koncentraciji vitamina C od 50 mM i molskom odnosu supstrata od 1:8, a u šaržnom bioreaktoru su primenjeni uslovi definisani u poglavlju 4.3.4. Odgovarajući relativni prinosi su prikazani na slici 4.51.



Slika 4.51. Operativna stabilnost CAL B imobilisane na Purolite® MN102 u šaržnom bioreaktoru i bioreaktoru sa fluidizovanim slojem.

Može se uočiti da aktivnost imobilisane lipaze većom brzinom pada u protočnom sistemu u kome nakon prvih 6 upotreba enzim zadržava 80 % svoje katalitičke aktivnosti, dok njegova relativna aktivnost posle 10 reakcionih ciklusa pada na 55,5 % početne. Sa druge strane, nakon 10 uzastopnih ciklusa upotrebe, aktivnost lipaze u šaržnom sistemu opada za svega 25 %. Ispitivanjem prisustva proteina u reakcionoj smeši nakon svake od upotreba biokatalizatora utvrđeno je da je sadržaj proteina jednak nuli, pa se pad aktivnosti ne može pripisati desorpciji lipaze, već se mora uzeti u obzir potencijalno inaktivirajuće delovanje smicajnih sila. Međutim, brzina kojom lipaza gubi aktivnost u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem je veća, iako je ustanovljeno da je u ovom sistemu manji intenzitet tangencijalnih sila, pa se gubitak aktivnosti ne može pripisati njihovom delovanju. Sa druge strane, moguće je da se pod laminarnim uslovima proticanja fluida hidrofobne komponente

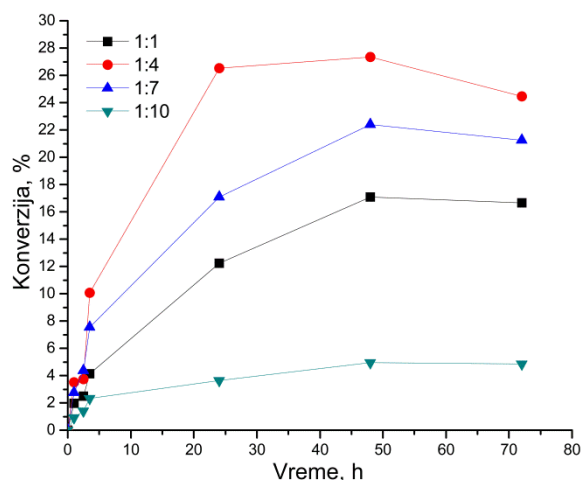
reakcione smeše (naročito masna kiselina) adsorbuju na izrazito hidrofobnu površinu nosača, a da ih standardnom procedurom ispiranja koja je primenjivana nije moguće isprati sa nosača, tako da iz ciklusa u ciklus molekuli imobilisanog enzima postaju sve manje dostupni za vezivanje drugog supstrata (vitamina C) i samim tim neaktivni. Za razliku od ovog sistema, u šaržnom bioreктору je režim strujanja fluida bio takav da je ostvarena razvijena turbulencija pa se može pretpostaviti da pod takvim uslovima nije moguće tako intenzivno sakupljanje hidrofobnih molekula na površini nosača, već oni ostaju u smeši fluida i ne onemogućavaju pristup molekulima drugog supstrata aktivnim centrima imobilisane lipaze.

4.7. Enzimaska sinteza askorbil-estara primenom polinezasićenih masnih kiselina i masti i ulja kao acil-donora

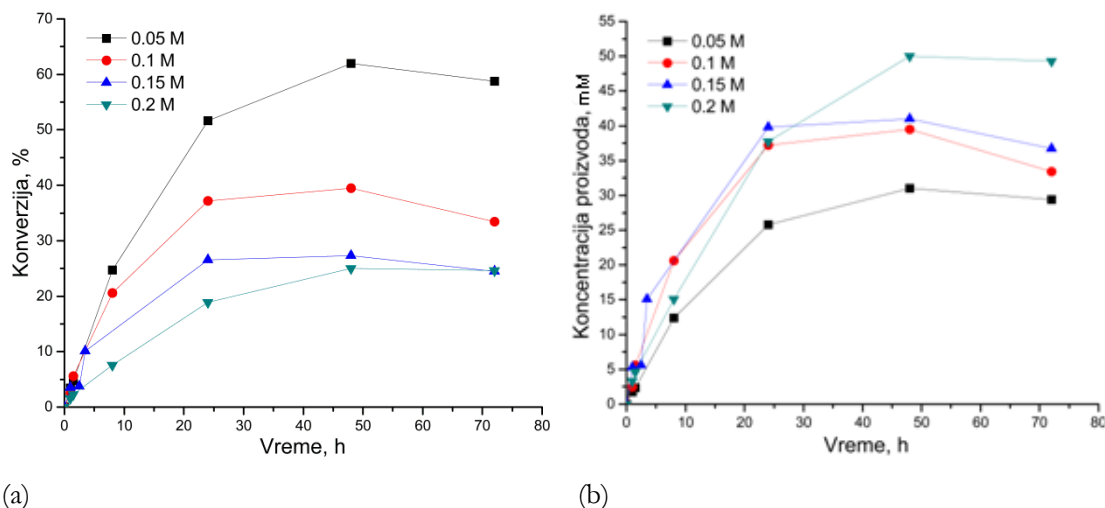
U prethodnom delu disertacije pokazano je da se L-askorbil-estri zasićenih karboksilnih kiselina, kao i mononezasićene oleinske kiseline mogu uspešno sintetisati primenom CAL B kao katalizatora. Već je obrazloženo da se primenom različitih donora acil-ostatka mogu dobiti proizvodi određenih karakteristika (lipofilnosti, antioksidativnog dejstva i nutritivne vrednosti), pa su dalji eksperimenti bili usmereni na testiranje drugih atraktivnih donora acil-ostatka – polinezasićene linolne kiseline i prirodnih sirovina (ulja i masti).

4.7.1. Enzimaska sinteza askorbil-linolata

Prvo je ispitana mogućnost sinteze L-askorbil-linolata u reakciji esterifikacije vitamina C i linolne kiseline. Linolna kiselina je Ω -6 masna kiselina sa dve *cis* dvostruke veze i ona je esencijalna masna kiselina u ljudskoj ishrani, ali je, kao i ostale PMK, veoma podložna autooksidativnim procesima pa je njeno prevođenje u stabilnije oblike od velikog značaja. Poznato je da poseduje antiinflamatorno dejstvo i da sprečava transepidermalni gubitak vlage što je čini veoma atraktivnom za upotrebu u topikalnim formulacijama, pa je čest sastojak kozmetičkih proizvoda.

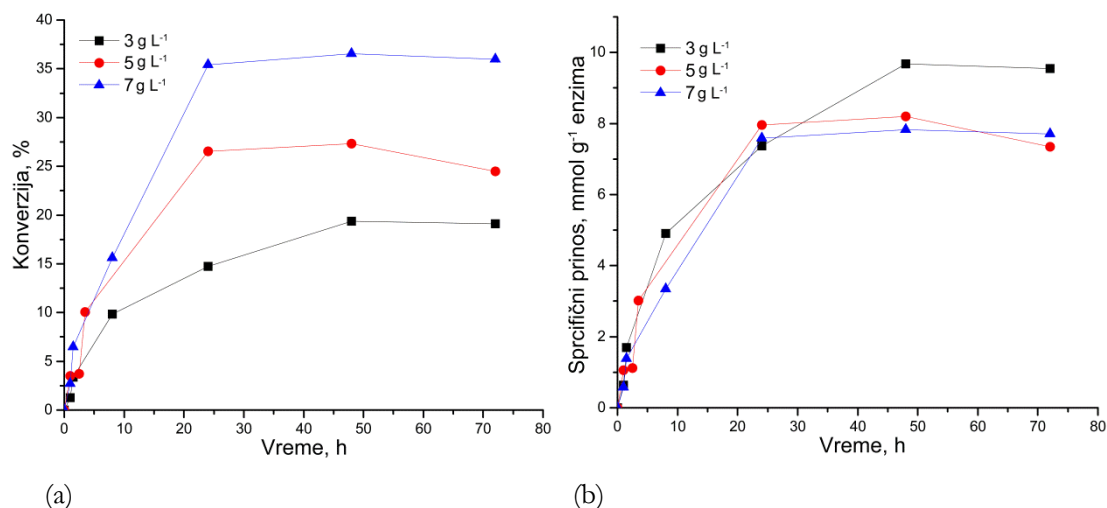


Slika 4.52. Uticaj molskog odnosa supstrata na stepen konverzije u reakciji esterifikacije vitamina C linolnom kiselinom. Reakcije su izvođene u toku 72 h u acetonu na 60 °C, pri koncentraciji vitamina C 0,15 M, 5 g L⁻¹ lipaze i pri početnom sadržaju vode od 0,07 %(v/v).



Slika 4.53. Uticaj koncentracije vitamina C na (a) stepen konverzije i (b) koncentraciju proizvoda u sintezi askorbil-linolata. Reakcije su izvođene u toku 72 h u acetonu na 60 °C, pri molском odnosu supstrata 1:4, 5 g L⁻¹ lipaze i pri početnom sadržaju vode od 0,07 %(v/v).

Rezultati detaljne optimizacije uslova enzimske sinteze askorbil-oleata poslužili su kao osnov za ispitivanje uticaja nekoliko ključnih faktora na esterifikaciju vitamina C linolnom kiselinom. Već je utvrđeno da se visoki prinosi askorbil-estara postižu kada je acil-donor prisutan u reakcionoj smeši u višku, pa je ovaj parametar variran u opsegu 1:1-1:10, a rezultati su predstavljeni na slici 4.52. Kao što se može primetiti, pri koncentraciji vitamina C od 0,15 M, maksimalni stepen konverzije se postiže pri molском odnosu supstrata od 1:4. Kada se ovaj rezultat uporedi sa optimumom za sintezu askorbil-oleata, uočava se da su za biosintezu askorbil-linolata pogodne manje koncentracije acil-donora. Ova razlika se može pripisati niskoj čistoći korišćene linolne kiseline (60 %) i činjenici da su u reakcionu smešu pri visokim molским odnosima dodavane i velike količine drugih hidrofobnih nečistoća. Kada je pri odabranom molском odnosu (1:4) varirana koncentracija vitamina C, utvrđeno je da postoji sličan trend kao kod sinteze askorbil-oleata (slika 4.53.). Pri nižim koncentracijama askorbinske kiseline su ostvareni maksimalni stepeni konverzije, dok su najviše koncentracije proizvoda sintetisane pri višim početnim koncentracijama vitamina C. Dalje je ispitan uticaj količine enzima na ostvareni stepen konverzije i specifični prinos estera. Koncentracija biokatalizatora je varirana u opsegu 3-7 g L⁻¹, a rezultati su prikazani na slici 4.54. Uočava se da početne brzine reakcije i prinosi koji su ostvareni u toku 72 h rastu sa porastom količine lipaze. Sa druge strane, maksimalni specifični prinos od 9,7 mmol estera po gramu enzima postignut je pri najnižoj koncentraciji enzima.



Slika 4.54. Uticaj koncentracije enzima na (a) stepen konverzije i (b) specifični prinos estra u sintezi askorbil-linolata. Reakcije su izvođene u toku 72 h u acetonu na 60 °C, pri koncentraciji vitamina C 0,15 M, molskom odnosu supstrata 1:4 i početnom sadržaju vode od 0,07 %(v/v).

L-askorbil-linolat sintetisan pod optimalnim uslovima (0,15 M vitamina C, molski odnos 1:4 i 3 g L⁻¹ enzima) je odvojen semipreparativnom RP-HPLC, a zatim je čista supstanca podvrgnuta spektralnim analizama i testiranju antioksidativnog dejstva. Određen je sledeći NMR spektar jedinjenja: ¹H NMR (200MHz, CDCl₃) δ 4,79 (H-4, 1H), δ 4,35 (H-5, 1H), δ 4,23 (H-6, 2H), δ 5,34 (H-9', H-10', H-12' i H-13', 4H), δ 2,77 (H-11', 2H), δ 2,35 (H-2', 2H), δ 2,03 (H-8' i H-14', 4H), δ 1,61 (H-17', 2H), δ 1,3 (H-3'-H-7', H-15' i H-16', 14H), δ 0,89 (H-18', 3H). Potvrđeno je i prisustvo karakterističnih funkcionalnih grupa: C¹³ NMR (50 MHz, CDCl₃) - CO-O (estarska) 172,73 ppm; CO (karbonilna) 174,21 ppm; enolni C 153,6 ppm i 118,53 ppm; CH=CH 130,22 ppm i 127,87 ppm. Time je potvrđeno da je izolovana supstanca 6-O-askorbil-linolat. Primenom DPPH metode je na isti način kao i za ostala ispitivana jedinjenja određen kapacitet askorbil-linolata za vezivanje slobodnih radikala. Utvrđeno je da IC₅₀ vrednost iznosi 1,033 μM, čime je pokazano da askorbil-linolat ima jaču antioksidativnu aktivnost od vitamina C, ali i da se sa povećanjem broja dvostrukih veza iznad jedne u nizu masnih kiselina sa 18 C atoma trend rasta kapaciteta za vezivanje DPPH-radikala koji je uočen i opisan u poglavlju 4.2.3. i dalje uočava. Na ovaj način je ustanovljeno da je L-askorbil-linolat molekul sa velikim potencijalom za primenu u različitim proizvodima (prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim), ali da je cena njegove proizvodnje primenom sintetske linolne kiseline (čak i tehničke čistoće) veoma visoka. S obzirom na to, sledeći korak je bilo testiranje alternativnih acil-donora (ulja i masti) bogatih ovom, ali i drugim značajnim masnim kiselinama, kako bi se utvrdila

mogućnost dobijanja proizvoda sličnih karakteristika uz značajno umanjeње troškova proizvodnje.

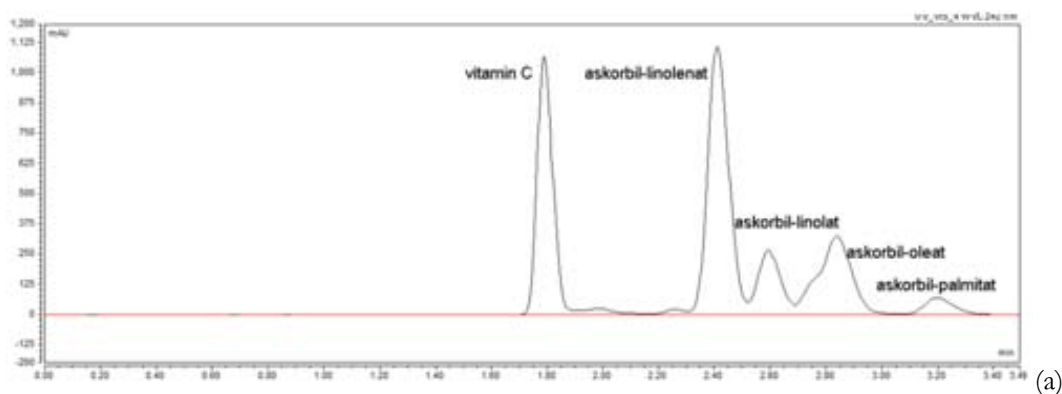
4.7.2. Enzimska sinteza smeše L-askorbil-estara masnih kiselina u reakciji transesterifikacije sa uljima i mastima kao donorima acil-ostatka

U prethodnim poglavljima ove disertacije je optimizovana sinteza estara vitamina C pomoću najfrekventnije korišćenog komercijalnog imobilisanog preparata na primeru sinteze askorbil-oleata, zatim je dodatni korak u razvoju ekonomičnijeg enzimskog procesa učinjen primenom novog, značajno jeftinijeg i podjednako efikasnog, enzimskog preparata u šaržnom i kontinualnom sistemu. U ovoj finalnoj fazi istraživanja optimizovana je sinteza smeše estara vitamina C transesterifikacijom iz masti i ulja, pošto se primenom prirodnih lipida kao značajno jeftinijih supstrata dodatno povećava ekonomičnost enzimskog procesa. Poslednjih godina je nekoliko autora ukazalo na prednosti korišćenja ulja i masti kao donora acil-ostatka u reakcijama sinteze L-askorbil-estara masnih kiselina među kojima su najznačajnije njihova niska cena i široka rasprostranjenost (39, 48, 50, 126, 129, 137, 150). Takođe se može očekivati da smeša estara pokazuje neke nove karakteristike, kao što su pojačano antioksidativno, antimikrobno ili emulgujuće dejstvo. Pored toga, takve proizvode je nakon separacije biokatalizatora i uparavanja rastvarača moguće koristiti bez daljeg prečišćavanja, i to u kozmetičkim preparatima, kao prehrambene proizvode sa poboljšanom nutritivnom vrednošću i stabilnošću ili kao dodatak stočnoj hrani. Nadalje, u poglavlju 4.2.3. ove disertacije je utvrđeno da svi ispitivani askorbil-estri masnih kiselina pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost, što čini ideju primene smeše estara dobijene u reakciji sa prirodnim jeftinim lipidnim supstratom vrlo atraktivnom. Iz tog razloga je finalni deo ove disertacije bio usmeren upravo na ispitivanje potencijala korišćenja nekoliko ulja i masti kao sirovina u cilju transesterifikacije sa vitaminom C. Kao kiselinski supstrati korišćena su sledeća ulja i masti veoma različitog masnokiselinskog sastava: kokosovo ulje, suncokretovo ulje, laneno ulje i svinjska mast.

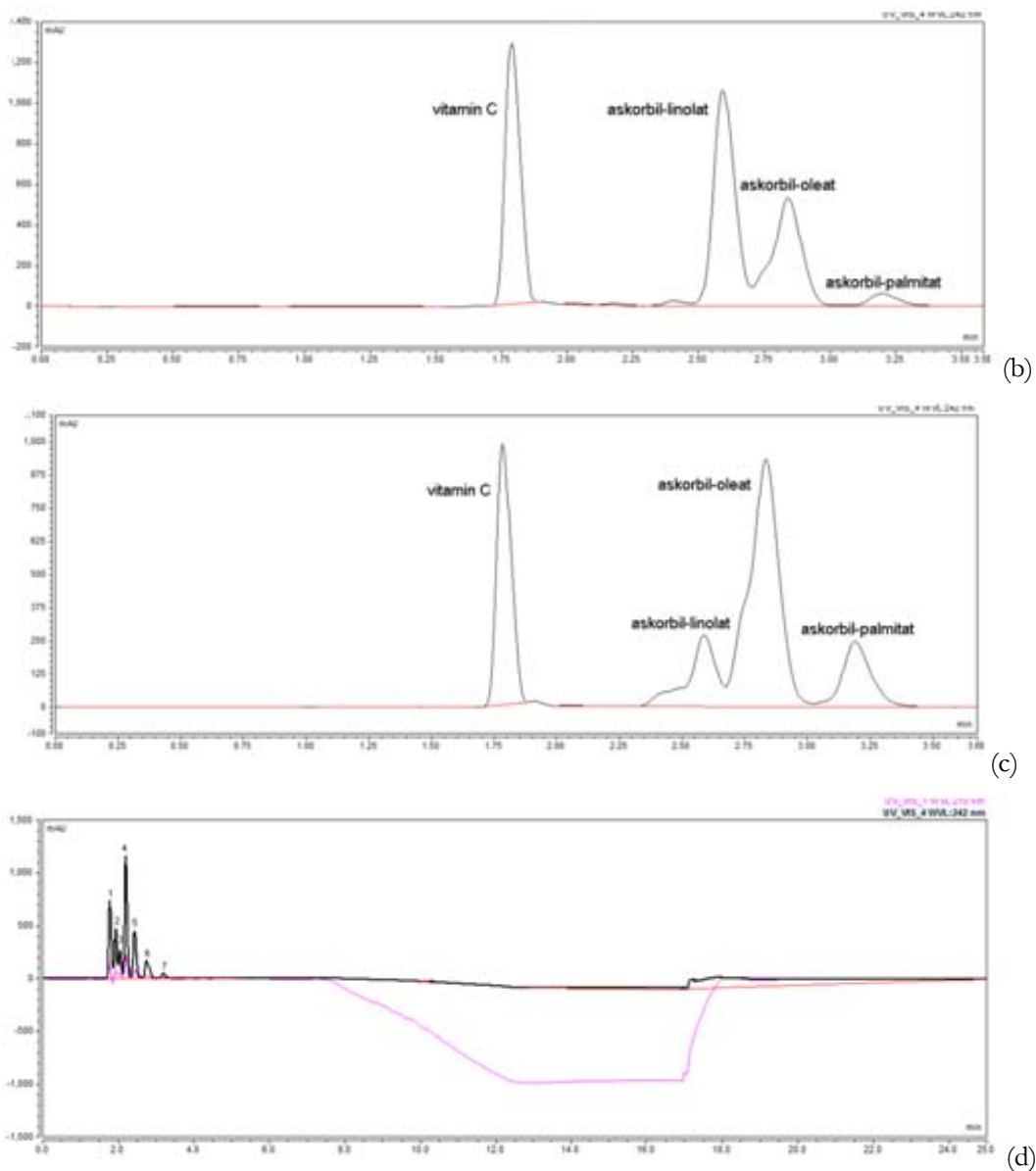
4.7.2.1. Razvoj HPLC metode za odvajanje smeša askorbil-estara masnih kiselina nastalih transesterifikacijom sa mastima i uljima

Kada se kao donori acil-ostatka za sintezu askorbil-estara primenjuju ulja ili masti, postupak hromatografskog odvajanja se mora razlikovati od slučaja kada su acil-donori čiste kiseline. Pored toga što se dobija složena smeša proizvoda sastavljena iz tri i više

jedinjenja, reakciona smeša je sastavljena iz molekula izuzetno različite polarnosti (najpolarniji je neproreagovali vitamin C, a najnepolarniji su trigliceridi), pa se pored metanola, acetonitrila i vode, koji su već primenjivani kao eluenti, mora koristiti i takav rastvarač čija će hidrofobnost obezbediti uslove pod kojima se izrazito hidrofobni acil-donori spiraju sa kolone. Takođe je, u cilju određivanja masnokiselinskog sastava svinjske masti i kokosovog ulja vršeno prevođenje masnih kiselina iz kojih su trigliceridi sastavljeni u metil-estre koji su nakon toga odvajani hromatografski i na osnovu standarda pojedinačnih metil-estara je utvrđen udeo svake od kiselina u acil-donorima. Sastav druga dva acil-donora (suncokretovog i lanenog ulja) bio je definisan proizvođačkom specifikacijom. U oba slučaja su testirane metode koje su uključivale različite gradijente u početnoj fazi elucije u kojoj se proizvodi ispiraju sa kolone, kao i primena nižih radnih protoka. Najbolje razdvajanje metil-estara ostvareno je u 85 % acetonitrilu u vodi u toku 10 minuta nakon čega je sledio gradijent do 100 % izopropanola. Radni protok je bio $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, a kolona je termostatirana na $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakcione smeše su odvajane izokratski, sa mobilnom fazom $\text{MeOH:H}_2\text{O} = 95:5 \%$ u toku prvih 5 minuta elucije, pri protoku 1 mL min^{-1} , nakon čega je primenjen gradijent do 100 % izopropanola, a kolona je termostatirana na $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tipični hromatogrami prikazani su na slici 4.55. Masnokiselinski sastavi korišćenih acil-donora predstavljeni su u tabeli 4.16.



(a)



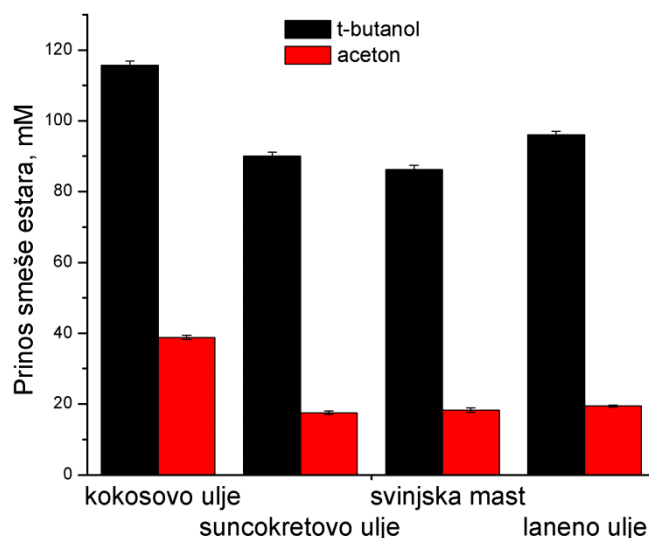
Slika 4.55. Tipični hromatogrami reakcionih smeša nakon transesterifikacije vitamina C sa: (a) lanenim uljem, (b) suncokretovim uljem, (c) svinjskom mašću i (d) kokosovim uljem (vitamin C (1) i askorbil-estri: (2) -kaprilat, (3) -kaprinat, (4) -laurat, (5) -miristat, (6) -oleat i (7) -palmitat).

Tabela 4.16. Masnokiselinski sastav masti i ulja korišćenih za transesterifikaciju sa vitaminom C.

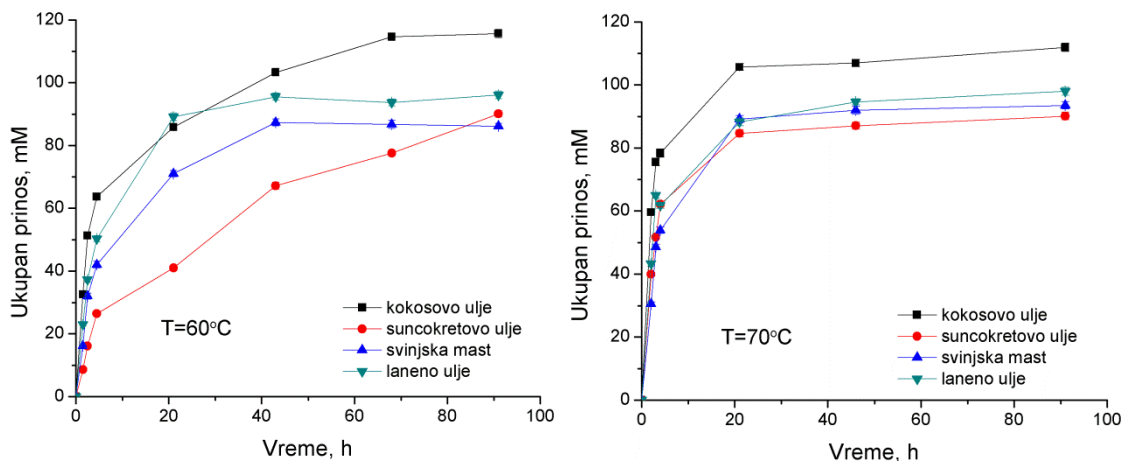
Acil-donor	Masna kiselina, %								
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3
suncokretovo ulje	-	-	-	-	11,9	-	29,8	58,3	-
svinjska mast	-	-	-	-	38,4	7,9	50,0	3,7	-
kokosovo ulje	19,0	7,8	46,4	16,6	5,2	-	5,0	-	-
laneno ulje	-	-	-	-	11,88	-	19,82	13,6	54,7

4.7.2.2. Optimizacija reakcionih faktora i karakterizacija proizvoda

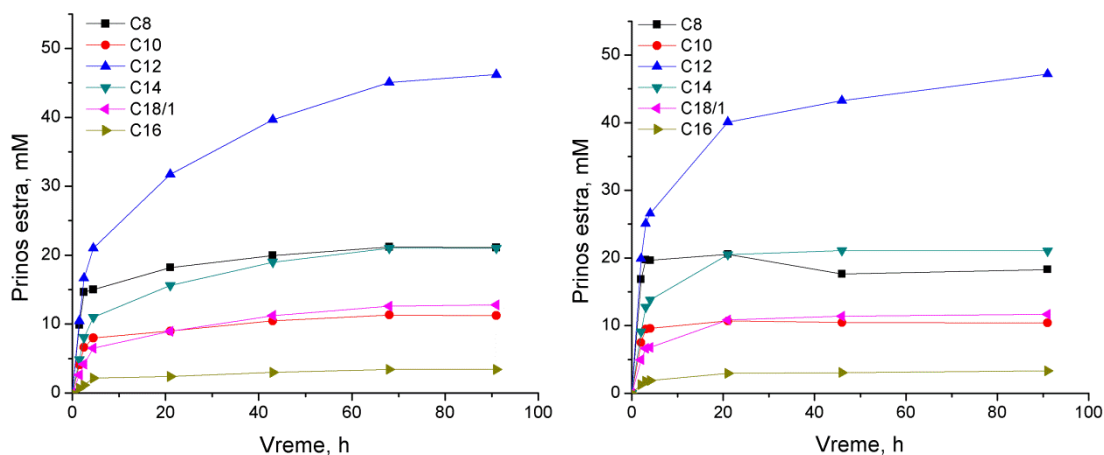
Kao reakcioni medijumi testirana su dva rastvarača koja su u prethodnom delu istraživanja okarakterisana kao najpogodnije sredine za izvođenje reakcije sinteze L-askorbil-estara, aceton i *t*-butanol. Dobijeni rezultati predstavljeni na slici 4.56. ukazuju na to da se znatno viši prinosi ostvaruju u *t*-butanolu. Ovaj rastvarač je i pri korišćenju masnih kiselina kao donora acil-ostatka omogućavao veći stepen konverzije limitirajućeg supstrata, ali je razlika između rezultata ostvarenih u dva rastvarača bila nešto manja. Potencijalni uzrok može ležati u činjenici da su ulja znatno hidrofobnija od masnih kiselina i da je samim tim mešljivost L-askorbinske kiseline sa njima manja, a takođe je i njena rastvorljivost u acetonu niža nego u *t*-butanolu što ovaj medijum (sistem ulje/aceton) čini nepogodnim za sintezu estara vitamina C zbog male raspoloživosti ovog supstrata u rastvorenom obliku. Aceton se prethodno pokazao kao dobar rastvarač u sintezi smeše estara vitamina C korišćenjem palminog i sojinog ulja kao sirovina, međutim u tom slučaju je najpre vršeno prevođenje masnokiselinskih ostataka u metil-estre koji su nakon toga korišćeni u transesterifikaciji sa L-askorbinskom kiselinom (137). Sa druge strane, kada je svinjska mast korišćena kao supstrat u sintezi L-askorbil-estara u reaktoru sa pakovanim slojem, kao rastvarač je korišćen *t*-amil alkohol (150). Isti rastvarač primenjen je i u studiji u kojoj je kao acil-donor korišćeno maslinovo ulje (129).



Slika 4.56. Uticaj rastvarača na ukupan prinos smeše askorbil-estara nastale transesterifikacijom sa kokosovim uljem, suncokretovim uljem, svinjskom mašću i lanenim uljem. Reakcije su izvođene na 60 °C, sa 0,135 M vitamina C, pri molaskom odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.



Slika 4.57. Uticaj temperature na brzinu transesterifikacije vitamina C sa uljima i ukupan prinos estara. Reakcije su izvođene u *t*-butanolu, sa 0,135 M vitamina C, pri molaskom odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.



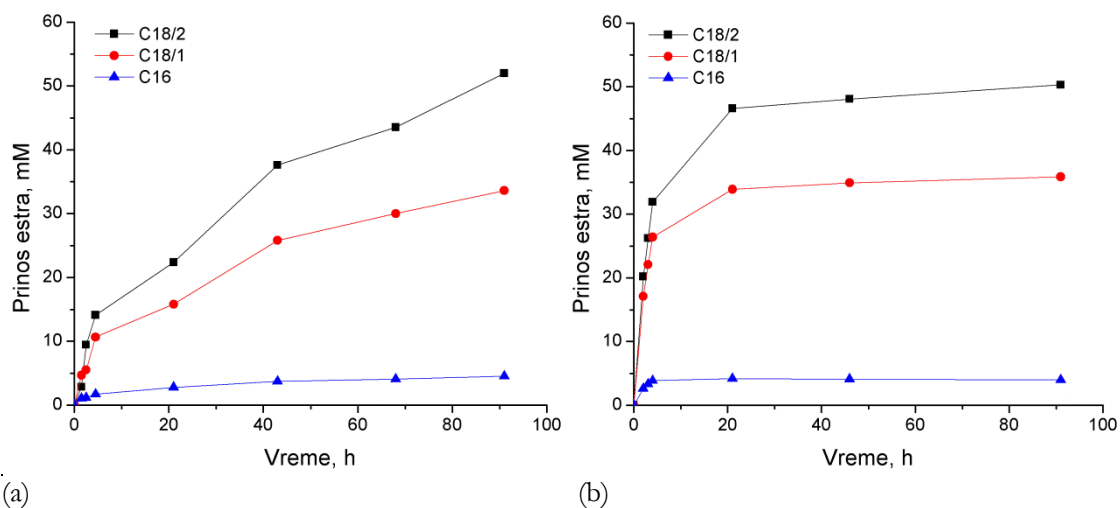
(a)

(b)

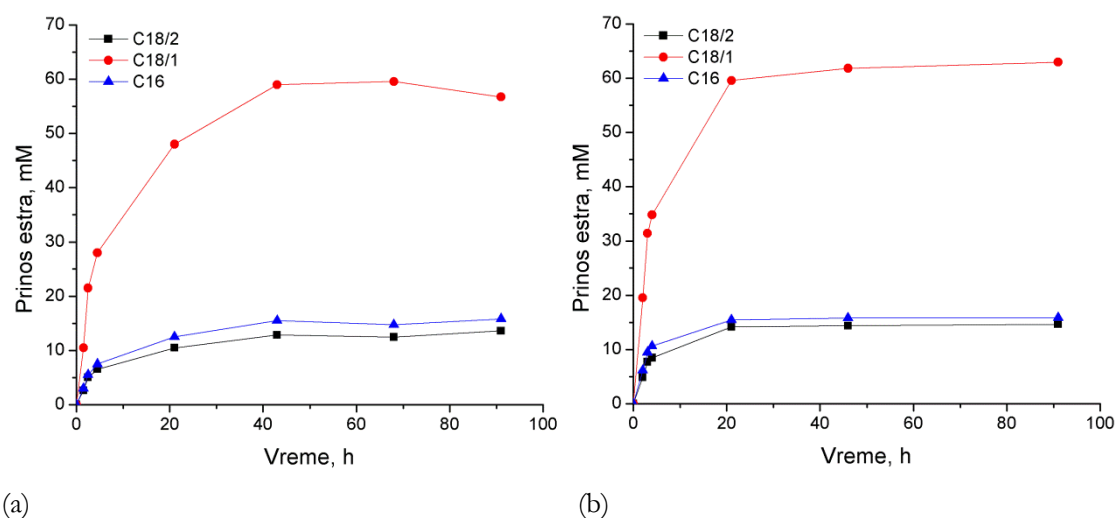
Slika 4.58. Prinos pojedinačnih estara u transesterifikaciji vitamina C i kokosovog ulja na 60 °C (a) i 70 °C (b). Reakcije su izvođene u *t*-butanolu, sa 0,135 M vitamina C, pri molaskom odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.

S obzirom na to da su preliminarni rezultati ostvareni pri prethodno optimizovanoj temperaturi (60 °C) za reakciju u acetonu bili zadovoljavajući, ali da je korišćenjem *t*-butanola omogućen rad i na višim temperaturama (do ~70 °C), dalji rad na povećanju brzine reakcije bio je usmeren u tom pravcu. Na slici 4.57. je dat uporedni prikaz reakcionih tokova na dve temperature – 60 i 70 °C iz koga se jasno vidi da se na obe temperature za sve testirane acil-donore u toku 91 h ostvaruje ista ili slična ravnotežna konverzija, međutim odgovarajuće vrednosti se na višoj temperaturi postižu znatno brže,

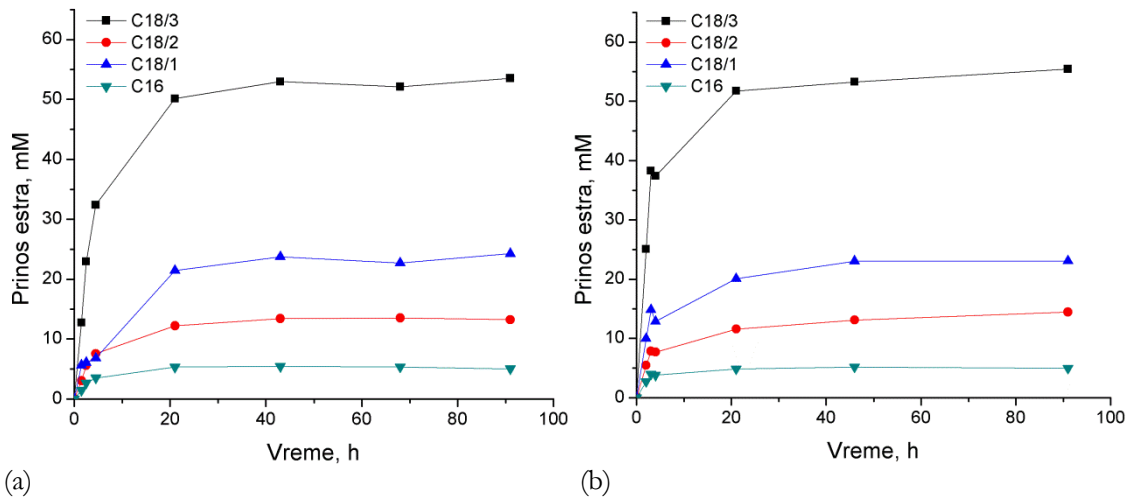
već nakon jednog dana. Iz tog razloga se može zaključiti da je u cilju ostvarivanja veće produktivnosti procesa poželjno reakciju izvoditi na 70 °C. Pored ukupnog prinosa smeše estara, reakcija se može pratiti i preko koncentracije pojedinačnih estara. Sa grafika 4.58.-4.61. se vidi da se udeo pojedinačnih estara u smeši ne menja sa promenom temperature. Takođe, iz prikazanih profila može se utvrditi tačan sastav finalnog proizvoda u svakom trenutku reakcije što dalje ukazuje na njegovu komercijalnu vrednost i potencijalno polje primene.



Slika 4.59. Prinos pojedinačnih estara u transesterifikaciji vitamina C i suncokretovog ulja na 60 °C (a) i 70 °C (b). Reakcije su izvođene u *t*-butanolu, sa 0,135 M vitamina C, pri molском odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.



Slika 4.60. Prinos pojedinačnih estara u transesterifikaciji vitamina C i svinjske masti na 60 °C (a) i 70 °C (b). Reakcije su izvođene u *t*-butanolu, sa 0,135 M vitamina C, pri molском odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.



Slika 4.61. Prinos pojedinačnih estara u transesterifikaciji vitamina C i lanenog ulja na 60 °C (a) i 70 °C (b). Reakcije su izvođene u *t*-butanolu, sa 0,135 M vitamina C, molskom odnosu supstrata 1:3 i sa 1 %(w/v) enzima.

S obzirom na to da su pri visokoj početnoj koncentraciji limitirajućeg supstrata, kako u poređenju sa literaturnim podacima, tako i u poređenju sa rezultatima ostvarenim sa masnim kiselinama u okviru ove studije, ostvarene visoke konverzije, 67-83 %, što odgovara prinosu smeše estara od 90 do 112 mM, ova vrsta proizvodnje ima veliki potencijal u dobijanju proizvoda koji može biti komponenta kozmetičkih proizvoda ili hrane. Činjenica da se ovi lipidni supstrati ponekad koriste u ovoj vrsti proizvoda omogućuje i jednostavan i jeftin postupak prečišćavanja proizvoda jer je dovoljno odvojiti hidrosolubilne supstance (glicerol i neproreagovali vitamin C) ekstrakcijom tečno-tečno, a zatim dobiti smešu neproreagovalih lipida i dobijenih estara vitamina C uklanjanjem rastvarača u vakuum uparivaču. Ovakav proizvod se uklapa u aktuelne trendove organske kozmetike koji podrazumevaju primenu biljnih ulja umesto sintetskih alifatičnih estara. Laneno ulje je atraktivno za primenu jer je najzastupljenija masna kiselina u sastavu njegovih triglicerida linolenska kiselina (C18:3), koja je vrlo skupa pa se transesterifikacijom ovog ulja izbegava primena skupog supstrata i dobija se proizvod koji sadrži visoku koncentraciju njenog askorbil-estra, kao i estara drugih nezasićenih kiselina (linolne i oleinske) (slika 4.61.). Kokosovo ulje se takođe često primenjuje u formulisanju kozmetičkih proizvoda jer sadrži pretežno zasićene masne kiseline koje teže podležu autooksidaciji pa su takvi proizvodi stabilniji, a sa slike 4.58. se može videti da se enzimskom transesterifikacijom ovo ulje može efikasno transformisati u smešu askorbil-estara. Takođe je dokazano da askorbil-laurat, koji je preovlađujuća komponenta finalnog

proizvoda, pored dobrih antioksidativnih poseduje i odlična emulgujuća i antimikrobna svojstva. Nadalje, sa slika 4.59. i 4.60. se može primetiti da se i jeftini supstrati (suncokretovo ulje i svinjska mast) mogu transformisati u smeše sa visokim sadržajem askorbil-linolata i askorbil-oleata umesto da se ovi estri sintetišu iz čistih masnih kiselina kao polaznih supstrata visoke cene. Dalji eksperimenti su bili usmereni na karakterizaciju dobijenih proizvoda.

Tabela 4.17. Antioksidativno dejstvo smeša askorbil-estara dobijenih transesterifikacijom sa mastima i uljima.

Acil-donor	Sastav smeše estara, %	IC₅₀ (μM)
svinjska mast	C18:2/C18:1/C16=15,78/65,82/18,4	0,838
suncokretovo ulje	C18:2/C18:1/C16=57,69/37,3/5,01	0,771
kokosovo ulje	C8/C10/C12/C14/C18:1/C16=18,25/9,71/39,93/18,15/11,03/2,9	0,739
laneno ulje	C18:3/C18:2/C18:1/C16=55,7/13,81/25,23/5,26	0,663

S obzirom na visoke prinose ostvarene u prethodnim eksperimentima, u daljim isptivanjima su dobijeni proizvodi karakterisani sa aspekta kapaciteta za vezivanje slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost smeša L-askorbil-estara određena je na način opisan u odeljku 3.2.8., a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.17. Iako se može uočiti da razlika između antioksidativne aktivnosti smeša estara dobijenih transesterifikacijom vitamina C sa testiranim uljima nije velika, naročito u poređenju sa rezultatima ostvarenim sa čistim estrima (tabela 4.2.), ANOVA analiza pokazuje da sastav smeše estara ipak pokazuje signifikantan uticaj ($p=0,015$) na kapacitet za vezivanje DPPH radikala. Uporednom analizom rezultata iz dve tabele, uočava se da su smeše estara efikasniji antioksidansi u odnosu na čiste estre, s obzirom na značajno niže IC₅₀ vrednosti. Upoređivanjem IC₅₀ vrednosti smeše askorbil-estara dobijene iz suncokretovog ulja (IC₅₀=0,771) i svinjske masti (IC₅₀=0,838) koje sadrže iste estre, samo u drugačijem odnosu, može se zaključiti da antioksidativna aktivnost raste sa povećanjem udela askorbil-linolata u smeši. Ovaj rezultat se u potpunosti poklapa sa rezultatom dobijenim kada su analizirani L-askorbil-stearat (IC₅₀=3,73 μ M), -oleat (IC₅₀=1,48 μ M) i -linolat (IC₅₀=1,033 μ M), gde je evidentno povećanje kapaciteta za vezivanje slobodnih radikala sa porastom stepena nezasićenosti acil-ostatka. Kada se vrednosti iz tabele 4.17. uporede sa IC₅₀ vrednostima pojedinačnih estara, takođe se može zaključiti da sintetisani estri u smeši pokazuju neku vrstu sinergističkog delovanja. Nešto bolju antioksidativnu aktivnost (IC₅₀=0,739) pokazala je smeša estara dobijena iz kokosovog ulja. U ovoj smeši

preovlađuju askorbil-estri sa acil-ostacima srednje dužine lanca, za koje je takođe ranije utvrđeno da poseduju veliki kapacitet za vezivanje DPPH-radikala, ali je on i u ovom slučaju prevazišao prost zbir antioksidativnih dejstava pojedinačnih komponenata smeše. Najjače antioksidativno dejstvo je pokazala smeša askorbil-estara dobijena iz lanenog ulja ($IC_{50}=0,663$) u kojoj više od 50 % čini askorbil-linolenat koji poseduje tri dvostruke veze, što potvrđuje činjenicu da se povećanjem broja dvostrukih veza donora acil-ostatka povećava antioksidativna aktivnost sintetisanog askorbil-estra. Ovaj rezultat je interesantan jer ukazuje na mogućnost stabilizacije PMK koje su veoma značajni sastojci u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, ali i izuzetno važni nutrijenti, pri čemu su ne samo iskombinovane osobine dva značajna biomolekula (PMK i vitamina C), već je dobijen proizvod sa poboljšanim svojstvima u odnosu na polazne komponente.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata eksperimenata izvedenih u okviru ove doktorske disertacije, koji su izloženi u prethodnim poglavljima, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Ispitivanje uticaja organskog rastvarača u kome se odigrava biosinteza askorbil-estara na ostvareni rezultat pokazalo je da se reakcija odvija isključivo u polarnim medijumima ($\log P < 1$), pri čemu je dobra rastvorljivost vitamina C u odabranom rastvaraču preduslov za visoke konverzije.
2. Kada se kao donori acil-ostatka u reakciji katalizovanoj lipazom tipa B producenta *C. antarctica* koriste karboksilne kiseline, visoki prinosi se ostvaruju sa zasićenim kiselinama kratke i srednje dužine lanca i nezasićenim masnim kiselinama dugog lanca.
3. Nakon esterifikacije vitamina C karboksilnim kiselinama u položaju 6, njegov kapacitet za vezivanje DPPH-radikala se ne umanjuje, već sintetisani estri uglavnom imaju poboljšano antioksidativno dejstvo. Askorbil-estri sa kratkim i srednjim acil-ostatkom, kao i mono- i polinezasićenim bočnim nizom dugog lanca su efikasniji "hvatači" slobodnih radikala od askorbil-estara zasićenih masnih kiselina dugog lanca.
4. Optimizacijom najznačajnijih reakcionih parametara kao što su temperatura, koncentracija supstrata, koncentracija enzima i početni sadržaj vode u medijumu omogućeno je povećanje stepena konverzije limitirajućeg supstrata i dobijanje većih koncentracija proizvoda. Utvrđeno je da pozitivan efekat na ostvarene rezultate ima izvođenje reakcije na visokoj temperaturi, niska početna koncentracija vode i prisustvo acil-donora u višku.
5. Statističko planiranje eksperimenata i analiza dobijenih rezultata metodom odzivnih površina omogućili su optimizaciju reakcionih faktora u reakciji sinteze L-askorbil-oleata sa aspekta tri ispitivana odziva (stepen konverzije limitirajućeg supstrata, koncentracija proizvoda i specifični prinos estera po masi biokatalizatora). Takođe je ostvaren uvid u međusobne interakcije variranih parametara i njihov združeni uticaj na odabrane odzive. Naročito značajan je zaključak da se velike koncentracije proizvoda mogu dobiti uz mali utrošak imobilisanog enzima. Na taj način, ostvaren je maksimalni specifični prinos proizvoda od 16,7 mmol askorbil-oleata po gramu imobilisanog enzima.

6. Primena molekularskih sita u cilju uklanjanja viška vode iz reakcione smeše, upotreba biokatalizatora u konsektivnim reakcionim ciklusima i reaktivacija tretiranjem fosfatnim puferom omogućavaju dalji porast ostvarenih prinosa i povećanje ekonomičnosti procesa.
7. Kinetika sinteze askorbil-oleata katalizovana komercijalnim imobilisanim preparatom Novozym[®] 435 se odvija prema ping-pong bi-bi mehanizmu sa inhibicijom acil-akceptorom (vitaminom C), a uključivanje uticaja povratne reakcije hidrolize u finalni model omogućava dobro poklapanje sa eksperimentalnim rezultatima i u dugim reakcionim vremenima.
8. Lipaza B iz *C. antarctica* imobilisana na nosače različite morfologije i hidrofobnosti/hidrofilnosti posredstvom različitih funkcionalnih grupa i mehanizama vezivanja (adsorpcija ili kovalentno vezivanje) pokazuje različitu aktivnost u reakciji sinteze askorbil-oleata. Svi imobilisani preparati su pokazali određenu esterifikacionu aktivnost, ali najveće koncentracije proizvoda ostvarene su sa lipazom imobilisanom na hidrofobnim nosačima.
9. CAL B imobilisana pod optimalnim uslovima na Purolite[®] MN102 (hidrofobni makroporozni nosač sa terciarnim amino-grupama na bazi stiren-divinilbenzena) posedovala je sličnu hidrolitičku ($888,4 \text{ } p\text{-NpBU g}^{-1}$) i esterifikacionu aktivnost kao Novozym[®] 435, a predviđeni troškovi njenog dobijanja bili su višestruko niži od cene komercijalnog preparata.
10. Kinetička analiza je pokazala da se reakcija katalizovana preparatom CAL B-Purolite[®] MN102 odvija u skladu sa ping-pong bi-bi mehanizmom sa uključenom inhibicijom acil-donorom. Afinitet lipaze imobilisane na nosač veće hidrofobnosti u odnosu na komercijalni prema hidrofobnom supstratu (oleinskoj kiselini) je povećan za oko 40 %, dok je prema hidrofilnom supstratu (vitamin C) smanjen čak 11 puta.
11. Imobilisani preparat CAL B-Purolite[®] MN102 je uspešno primenjen u semikontinualnom sistemu, u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem lipaze i recirkulacijom supstrata. U poređenju sa šaržnim bioreaktorom sa orbitalnim mešanjem ostvarene su za oko 40 % veće početne brzine reakcije, ali je enzim pokazao manju operativnu stabilnost (55,5 % zadržane aktivnosti nakon 200 h upotrebe u odnosu na 75 % zadržane aktivnosti u šaržnom sistemu).

12. Hidrodinamički proračun je pokazao da ni u jednom od dva ispitivana sistema pod odabranim radnim uslovima nema otpora spoljašnjem ($Da \ll 1$) i unutrašnjem ($\Phi < 0,3$) prenosu mase, kao i da naponi smicanja kojima su molekuli lipaze na spoljašnjoj površini čestice izloženi ne doprinose značajno brzini inaktivacije pri upotrebi u konsektivnim reakcionim ciklusima.
13. Korišćenjem jestivih ulja i masti kao jeftinih i dostupnih donora acil-ostatka ostvareni su visoki prinosi proizvoda (do 112 mM ili 83 %) sastavljenih iz smeše askorbil-estara različitog sastava i potencijalnog polja primene.
14. Smeše askorbil-estara dobijene transesterifikacijom sa mastima i uljima pokazale su veću antioksidativnu aktivnost od pojedinačnih estara od kojih su sastavljene.

6. LITERATURA

1. Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK. Food Antioxidants: Technological: Toxicological and Health Perspectives: Taylor & Francis; 1995.
2. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon MH. Antioxidants in Food: Practical Applications: Taylor & Francis; 2001.
3. Babović N. Antioksidativne osobine frakcija dobijenih iz odabranih biljaka familije *Lamiaceae* postupkom natkritične ekstrakcije [doktorska disertacija]. Beograd, Srbija: Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2010.
4. Watson DH. Food Chemical Safety: Additives: CRC Press; 2002.
5. Kaitaranta J. Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. *J Am Oil Chem Soc.* 1992;69(8):810-3.
6. Lanigan RS, Yamarik TA, Andersen FA. Final report on the safety assessment of BHT. *International Journal of Toxicology.* 2002;21(2):19-94.
7. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition.* 1992;32(1):67-103.
8. Domitrović R. Vitamin C in disease prevention and therapy. *Biochemia Medica.* 2006;16(2):107-25.
9. Liu XY, Guo FL, Wu LM, Liu YC, Liu ZL. Remarkable enhancement of antioxidant activity of vitamin C in an artificial bilayer by making it lipo-soluble. *Chemistry and Physics of Lipids.* 1996;83(1):39-43.
10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Ascorbic acid. *Free radicals in biology and medicine:* Clarendon Press; 1989.
11. Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radical Research.* 2000;33(6):809-17.
12. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal.* 2007;274(1):1-22.
13. Naidu KA, Karl RC, Naidu KA, Coppola D. Antiproliferative and proapoptotic effect of ascorbyl stearate in human pancreatic cancer cells: Association with decreased expression of insulin-like growth factor 1 receptor. *Digestive Diseases and Sciences.* 2003;48(1):230-7.
14. Karmee SK. Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2009;81(6):1013-22.

15. Lo Nostro P, Capuzzi G, Romani A, Mulinacci N. Self-assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-*O*-ascorbic acid. *Langmuir*. 2000;16(4):1744-50.
16. Bezbradica D. Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima [doktorska disertacija]. Beograd, Srbija: Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2007.
17. Cousins R, Seib P, Hosoney RC, Deyoe C, Liang Y, Lillard D. Synthesis of 6-fatty acid esters of l-ascorbic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1977;54(8):308-12.
18. Daniel S, Wells PA. Derivatives of ascorbic acid. US2350435 A; 1944.
19. Seib PA, Cousins RC, Hosoney RC. Method of synthesizing fatty acid esters of ascorbic acid. US4151178 A; 1979.
20. Nickels H, Hackenberger A. Preparation of fatty acid esters of ascorbic acid. US4705869 A; 1987.
21. Enomoto K, Miyamori T, Sakimae A, Numazawa R. Process for the enzymatic preparation of organic esters of ascorbic acid or erythorbic acid. US5071753 A; 1991.
22. Idris A, Zain NAM, Suhaimi MS. Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA-alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry*. 2008;43(4):331-8.
23. Mohd Zain NA, Mohd Suardi S, Idris A. Hydrolysis of liquid pineapple waste by invertase immobilized in PVA-alginate matrix. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;50(3):83-9.
24. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity *via* immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(6):1451-63.
25. Mihailović M, Stojanović M, Banjanac K, Carević M, Prlainović N, Milosavić N, et al. Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite[®] A109 and its post-immobilization stabilization. *Process Biochemistry*. 2014;49(4):637-46.
26. Knežević-Jugović Z. Enzimsko inženjerstvo. Beograd, Srbija: Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2008.
27. Idris A, Bukhari A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*. 2012;30(3):550-63.

28. Karim MR, Hashinaga F. Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase. *Process Biochemistry*. 2002;38(5):809-14.
29. Persson M, Bülow L, Mosbach K. Purification and site-specific immobilization of genetically engineered glucose dehydrogenase on thiopropyl-sepharose. *FEBS Letters*. 1990;270(1-2):41-4.
30. Chase Jr T, Shaw E. *p*-Nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate HCl: A new active site titrant for trypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1967;29(4):508-14.
31. Lalonde J. Practical catalysis with enzyme crystals. *CHEMTECH*. 1997;27(2):38-45.
32. Margolin AL. Novel crystalline catalysts. *Trends in Biotechnology*. 1996;14(7):223-30.
33. Sheldon RA, Schoevaart R, Van Langen LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2005;23(3-4):141-7.
34. Sheldon RA. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;92(3):467-77.
35. Aytar BS, Bakir U. Preparation of cross-linked tyrosinase aggregates. *Process Biochemistry*. 2008;43(2):125-31.
36. Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, Van Rantwijk F, et al. Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;87(6):754-62.
37. Yan J, Gui X, Wang G, Yan Y. Improving stability and activity of cross-linked enzyme aggregates based on polyethylenimine in hydrolysis of fish oil for enrichment of polyunsaturated fatty acids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;166(4):925-32.
38. Raita M, Laosiripojana N, Champreda V. Biocatalytic methanolysis activities of cross-linked protein-coated microcrystalline lipase toward esterification/transesterification of relevant palm products. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015;70:28-34.
39. Raita M, Laothanachareon T, Champreda V, Laosiripojana N. Biocatalytic esterification of palm oil fatty acids for biodiesel production using glycine-based cross-linked protein coated microcrystalline lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;73(1-4):74-9.

40. Kartal F, Janssen MHA, Hollmann F, Sheldon RA, Kilinc A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;71(3-4):85-9.
41. Cao L, Fischer A, Bornscheuer UT, Schmid RD. Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid esters. *Biocatalysis and Biotransformation*. 1997;14(4):269-83.
42. Knežević Z. Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze u dijalizatoru [doktorska disertacija]. Beograd, Srbija: Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2003.
43. Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. 1998;5(1-4):19-23.
44. Kuwabara K, Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Synthesis of 6-O-unsaturated acyl L-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;16(1):17-22.
45. Lerin LA, Richetti A, Dallago R, Treichel H, Mazutti MA, Oliveira JV, et al. Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(3):1068-76.
46. Viklund F, Alander J, Hult K. Antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl FA esters. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003;80(8):795-9.
47. Watanabe Y, Kuwabara K, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Production of saturated Acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(16):4628-32.
48. Burham H, Rasheed RAGA, Noor NM, Badruddin S, Sidek H. Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;58(1-4):153-7.
49. Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999;76(12):1505-10.
50. Reyes-Duarte D, Lopez-Cortes N, Torres P, Comelles F, Parra JL, Peña S, et al. Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL im using triglycerides as acyl donors. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011;88(1):57-64.

51. Zhang DH, Lv YQ, Zhi GY, Yuwen LX. Kinetic biosynthesis of l-ascorbyl acetate by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase (Lipozyme TLIM). *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2011;34(9):1163-8.
52. Zhang DH, Li YQ, Li C, Lv YQ, Yang L. Kinetics of enzymatic synthesis of L-ascorbyl acetate by Lipozyme TLIM and Novozym 435. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012;17(1):60-6.
53. Bradoo S, Saxena RK, Gupta R. High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999;76(11):1291-5.
54. Kidwai M, Mothra P, Gupta N, Kumar SS, Gupta R. Green enzymatic synthesis of L-ascorbyl fatty acid ester: An antioxidant. *Synthetic Communications*. 2009;39(7):1143-51.
55. Hsieh HJ, Nair GR, Wu WT. Production of ascorbyl palmitate by surfactant-coated lipase in organic media. *J Agric Food Chem*. 2006;54(16):5777-81.
56. Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 1998;16(3):181-204.
57. Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Hari Krishna S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(10):433-7.
58. Palomo JM, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fuentes M, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: Kinetic resolution of (\pm)-*a*-hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. 2002;13(12):1337-45.
59. Foresti ML, Ferreira ML. Computational approach to solvent-free synthesis of ethyl oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B lipases. I. Interfacial activation and substrate (ethanol, oleic acid) adsorption. *Biomacromolecules*. 2004;5(6):2366-75.
60. Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*. 1994;2(4):293-308.
61. Uppenberg J, Öhrner N, Norin M, Hult K, Kleywegt GJ, Patkar S, et al. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*. 1995;34(51):16838-51.

62. Ohtani T, Nakatsukasa H, Kamezawa M, Tachibana H, Naoshima Y. Enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase for some synthetic substrates including aliphatic secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. 1998;4(1-2):53-60.
63. Martinelle M, Holmquist M, Hult K. 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):272-6.
64. Chen B, Hu J, Miller EM, Xie W, Cai M, Gross RA. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules*. 2008;9(2):463-71.
65. Nakaoki T, Kalra B, Kumar A, Gross RA, Kirk O, Christensen M, editors. *Candida antarctica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: Effect of immobilization matrix on polymerization kinetics and molecular weight. American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry; 2002.
66. Zhao H, Song Z. Migration of reactive trace compounds from Novozym[®] 435 into organic solvents and ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;49(1):113-8.
67. Miletić N, Abetz V, Ebert K, Loos K. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on polystyrene nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications*. 2010;31(1):71-4.
68. Torres R, Ortiz C, Pessela BCC, Palomo JM, Mateo C, Guisán JM, et al. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(2):167-71.
69. Tziaila AA, Pavlidis IV, Felicissimo MP, Rudolf P, Gournis D, Stamatis H. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene. *Bioresource Technology*. 2010;101(6):1587-94.
70. Ye P, Xu ZK, Wang ZG, Wu J, Deng HT, Seta P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005;32(4):115-21.
71. Salis A, Meloni D, Ligas S, Casula MF, Monduzzi M, Solinas V, et al. Physical and chemical adsorption of *Mucor javanicus* lipase on SBA-15 mesoporous silica. Synthesis, structural characterization, and activity performance. *Langmuir*. 2005;21(12):5511-6.

72. Arroyo M, Sánchez-Montero JMa, Sinisterra JV. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999;24(1–2):3-12.
73. Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*. 2012;47(8):1220-7.
74. Miletic N, Rohandi R, Vukovic Z, Nastasovic A, Loos K. Surface modification of macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins for improved *Candida antarctica* lipase B immobilization. *Reactive and Functional Polymers*. 2009;69(1):68-75.
75. Silva JA, Macedo GP, Rodrigues DS, Giordano RLC, Gonçalves LRB. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*. 2012;60:16-24.
76. Rodrigues DS, Mendes AA, Adriano WS, Gonçalves LRB, Giordano RLC. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008;51(3-4):100-9.
77. Bukhari A, Idris A, Atta M, Loong TC. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*. 2014;35(9):1555-64.
78. Prabhavathi Devi BLA, Guo Z, Xu X. Characterization of cross-linked lipase aggregates. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2009;86(7):637-42.
79. Hobbs HR, Kondor B, Stephenson P, Sheldon RA, Thomas NR, Poliakov M. Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO₂. *Green Chemistry*. 2006;8(9):816-21.
80. Cruz J, Barbosa O, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R, Torres R, Ortiz C. Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012;80:7-14.
81. Galvis M, Barbosa O, Ruiz M, Cruz J, Ortiz C, Torres R, et al. Chemical amination of lipase B from *Candida antarctica* is an efficient solution for the preparation of crosslinked enzyme aggregates. *Process Biochemistry*. 2012;47(12):2373-8.

82. Prathumpai W, Flitter SJ, McIntyre M, Nielsen J. Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;65(6):714-9.
83. Peng L, Xu X, Mu H, Høy CE, Adler-Nissen J. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(4):523-32.
84. Jha BK, Svensson M, Kronberg B, Holmberg K. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999;213(1):262-4.
85. Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;62(3-4):197-212.
86. Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Yamaguchi S, Joerger R, et al. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Engineering*. 1994;7(4):551-7.
87. Holmquist M, Clausen IG, Patkar S, Svendsen A, Hult K. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. *Journal of Protein Chemistry*. 1995;14(4):217-24.
88. Fernandes MLM, Krieger N, Baron AM, Zamora PP, Ramos LP, Mitchell DA. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004;30(1):43-9.
89. Rodrigues RC, Godoy CA, Volpato G, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. *Process Biochemistry*. 2009;44(9):963-8.
90. Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*. 2003;4(1):1-6.
91. Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification *via* specific lipase-lipase interactions. *Journal of Chromatography A*. 2004;1038(1-2):267-73.

92. Söderlund T, Zhu K, Jutila A, Kinnunen PKJ. Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2002;26(1-2):75-83.
93. Jutila A, Zhu K, Patkar SA, Vind J, Svendsen A, Kinnunen PKJ. Detergent-induced conformational changes of *Humicola lanuginosa* lipase studied by fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2000;78(3):1634-42.
94. Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007;97(2):242-50.
95. Cabrera Z, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Partial and enantioselective hydrolysis of diethyl phenylmalonate by immobilized preparations of lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(5):1280-5.
96. López-Serrano P, Cao L, Van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. *Biotechnology Letters*. 2002;24(16):1379-83.
97. Charusheela A, Arvind L. Enzyme catalyzed hydrolysis of esters using reversibly soluble polymer conjugated lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;30(1):19-25.
98. Koneracká M, Kopčanský P, Antalík M, Timko M, Ramchand CN, Lobo D, et al. Immobilization of proteins and enzymes to fine magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999;201(1-3):427-30.
99. Betancor L, Fuentes M, Dellamora-Ortiz G, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, et al. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005;32(3):97-101.
100. Rodrigues RC, Godoy CA, Filice M, Bolivar JM, Palau-Ors A, Garcia-Vargas JM, et al. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*. 2009;44(6):641-6.
101. Rodrigues RC, Bolivar JM, Palau-Ors A, Volpato G, Ayub MAZ, Fernandez-Lafuente R, et al. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2009;44(6-7):386-93.

102. Rodrigues RC, Bolivar JM, Volpato G, Filice M, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, et al. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. *Journal of Biotechnology*. 2009;144(2):113-9.
103. Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Rhizomucor miebei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;66(1-2):15-32.
104. Huge-Jensen B, Galluzzo DR, Jensen RG. Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miebei*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1988;65(6):905-10.
105. Miller C, Austin H, Posorske L, Gonzalez J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1988;65(6):927-31.
106. Boel E, Huge-Jensen B, Christensen M, Thim L, Fiil NP. *Rhizomucor miebei* triglyceride lipase is synthesized as a precursor. *Lipids*. 1988;23(7):701-6.
107. Wu XY, Jääskeläinen S, Linko YY. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miebei* lipase for ester synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. 1996;59(2):145-58.
108. Derewenda ZS, Derewenda U. Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 1991;69(12):842-51.
109. Derewenda ZS, Derewenda U, Dodson GG. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miebei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1992;227(3):818-39.
110. Holmquist M, Norin M, Hult K. The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miebei* lipase. *Lipids*. 1993;28(8):721-6.
111. Valivety RH, Halling PJ, Peilow AD, Macrae AR. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1992;1122(2):143-6.
112. Noel M, Combes D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miebei* lipase stability. *Journal of Biotechnology*. 2003;102(1):23-32.
113. Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial

adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998;58(5):486-93.

114. Aucoin MG, Erhardt FA, Legge RL. Hyperactivation of *Rhizomucor miehei* lipase by hydrophobic xerogels. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;85(6):647-55.

115. Petkar M, Lali A, Caimi P, Daminati M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006;39(1-4):83-90.

116. Reis P, Holmberg K, Debeche T, Folmer B, Fauconnot L, Watzke H. Lipase-catalyzed reactions at different surfaces. *Langmuir*. 2006;22(19):8169-77.

117. Rocha JMS, Gil MH, Garcia FAP. Effects of additives on the activity of a covalently immobilised lipase in organic media. *Journal of Biotechnology*. 1998;66(1):61-7.

118. Vasudevan PT, López-Cortés N, Caswell H, Reyes-Duarte D, Plou FJ, Ballesteros A, et al. A novel hydrophilic support, CoFoam, for enzyme immobilization. *Biotechnology Letters*. 2004;26(6):473-7.

119. Grazú V, Abian O, Mateo C, Batista-Viera F, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005;90(5):597-605.

120. Rocha JMS, Gil MH, Garcia FAP. New polymeric supports can improve enzymatic catalysis in non-conventional media. *Key Engineering Materials*. 2002;230-232:475-8.

121. Blattner C, Zoumpantioti M, Kröner J, Schmeer G, Xenakis A, Kunz W. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006;36(3):182-93.

122. Pastou A, Stamatis H, Xenakis A. Microemulsion-based organogels containing lipase: application in the synthesis of esters. *Trends in Colloid and Interface Science XIV*. 2000;115:192-5.

123. Delimitsou C, Zoumopaniott M, Xenakis A, Stamatis H. Activity and Stability Studies Of *Mucor miehei* Lipase Immobilized in Novel Microemulsion-based Organogels. *Biocatalysis & Biotransformation*. 2002;20(5):319-27.

124. Zoumpantioti M, Parmaklis P, de María PD, Stamatis H, Sinisterra JV, Xenakis A. Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels: effect of temperature and substrate diffusion. *Biotechnology Letters*. 2008;30(9):1627-31.

125. Song QX, Wei DZ. Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002;18(4-6):261-6.

126. Zhao H, Zhang Y, Lu F, Bie X, Lu Z, Ning H. Optimized enzymatic synthesis of ascorbyl esters from lard using Novozym 435 in co-solvent mixtures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;69(3-4):107-11.
127. Yan Y, Bornscheuer UT, Schmid RD. Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters. *Biotechnology Letters*. 1999;21(12):1051-4.
128. Park S, Viklund F, Hult K, Kazlauskas RJ. Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: Synthesis of a natural surface active antioxidant. *Green Chemistry*. 2003;5(6):715-9.
129. Moreno-Perez S, Filice M, Guisan JM, Fernandez-Lorente G. Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2013;174:48-54.
130. Sun WJ, Zhao HX, Cui FJ, Li YH, Yu SL, Zhou Q, et al. D-isoascorbyl palmitate: Lipase-catalyzed synthesis, structural characterization and process optimization using response surface methodology. *Chemistry Central Journal*. 2013;7(1).
131. Yang Z, Schultz L, Guo Z, Jacobsen C, Xu X. System development from organic solvents to ionic liquids for synthesizing ascorbyl esters with conjugated linoleic acids. *Open Biotechnology Journal*. 2012;6(1):5-12.
132. Watanabe Y, Sawahara Y, Nosaka H, Yamanaka K, Adachi S. Enzymatic synthesis of conjugated linoleoyl ascorbate in acetone. *Biochemical Engineering Journal*. 2008;40(2):368-72.
133. Costa ICR, Sutili FK, Da Silva GVV, Leite SGF, Miranda LSM, De Souza ROMA. Lipase catalyzed ascorbyl palmitate synthesis under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014;102:127-31.
134. Selmi B, Gontier E, Ergan F, Thomas D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998;23(3-4):182-6.
135. Song Q, Zhao Y, Xu W, Zhou W, Wei D. Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate in organic media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2006;28(4):211-5.
136. Bradoo S, Rathi P, Saxena RK, Gupta R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2002;51(2):115-20.
137. Hsieh HJ, Chen JW, Gridhar R, Wu WT. Synthesis of mixed esters of ascorbic acid using methyl esters of palm and soybean oils. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2005;35(2):113-8.

138. Humeau C, Girardin M, Rovel B, Miclo A. Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate. *Journal of Biotechnology*. 1998;63(1):1-8.
139. Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. Synthesis of ascorbyloleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. *Process Biochemistry*. 2005 10//;40(10):3177-80.
140. Chang SW, Yang CJ, Chen FY, Akoh CC, Shieh CJ. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-ascorbyl laurate by Novozym[®] 435. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;56(1):7-12.
141. Lv LX, Chen SY, Li YQ. Study of lipase-catalysed synthesis of ascorbyl benzoate in cyclohexanone using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(4):659-66.
142. Adamczak M, Bornscheuer UT. Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates. *Process Biochemistry*. 2009;44(3):257-61.
143. Hirata H, Higuchi K, Yamashina T. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvent: Effects of water and solvent, thermal stability and some applications. *Journal of Biotechnology*. 1990;14(2):157-67.
144. Yadav GD, Lathi PS. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004;27(2-3):113-9.
145. Cui YM, Wei DZ, Yu JT. Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen. *Biotechnology Letters*. 1997;19(9):865-8.
146. Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Lipase-catalyzed synthesis of unsaturated acyl L-ascorbates and their ability to suppress the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001;78(8):823-6.
147. Hu YD, Qin YZ, Li N, Zong MH. Highly efficient enzymatic synthesis of an ascorbyl unsaturated fatty acid ester with ecofriendly biomass-derived 2-methyltetrahydrofuran as cosolvent. *Biotechnology Progress*. 30(5):1005-11.
148. Kuwabara K, Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Continuous Production of Acyl L-Ascorbates Using a Packed-Bed Reactor with Immobilized Lipase. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003;80(9):895-9.

149. Zhao D, Liao Y, Zhang ZD. Toxicity of ionic liquids. *Clean - Soil, Air, Water*. 2007;35(1):42-8.
150. Zhao H, Liu J, Lv F, Ye R, Bie X, Zhang C, et al. Enzymatic synthesis of lard-based ascorbyl esters in a packed-bed reactor: Optimization by response surface methodology and evaluation of antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 2014;57(1):393-9.
151. Cleland WW. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*. 1963;67(C):104-37.
152. Bisswanger H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*: Wiley; 2008.
153. Segel IH. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*: Wiley; 1993.
154. Yadav GD, Lathi PS. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;16(3):245-52.
155. Kraai GN, Winkelman JGM, de Vries JG, Heeres HJ. Kinetic studies on the *Rhizomucor miebei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochemical Engineering Journal*. 2008;41(1):87-94.
156. Hari Krishna S, Karanth NG. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2001;1547(2):262-7.
157. Chowdary GV, Prapulla SG. Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents. *Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry*. 2005;44(11):2322-7.
158. Garcia T, Coteron A, Martinez M, Aracil J. Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases. *Chemical Engineering Science*. 1996;51(11):2841-6.
159. Luhong T, Hao Z, Shehate MM, Yunfei S. A kinetic study of the synthesis of ascorbate fatty acid esters catalysed by immobilized lipase in organic media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000;32(1):35-9.
160. Zhang DH, Li C, Zhi GY. Kinetic and thermodynamic investigation of enzymatic l-ascorbyl acetate synthesis. *Journal of Biotechnology*. 2013;168(4):416-20.
161. Tadros TF. *Applied Surfactants: Principles and Applications*: Wiley; 2005.

162. Davis JT. A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface (Proceedings of the International Congress of Surface Activity)*. 1957:426-38.
163. Palma S, Manzo RH, Allemandi D, Fratoni L, Nostro PL. Solubilization of hydrophobic drugs in octanoyl-6-*O*-ascorbic acid micellar dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;91(8):1810-6.
164. Kuwabara K, Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Emulsifier properties of saturated acyl L-ascorbates for preparation of O/W emulsions. *Food Chemistry*. 2003;82(2):191-4.
165. Kharrat N, Aissa I, Sghaier M, Bouaziz M, Sellami M, Laouini D, et al. Lipophilization of ascorbic acid: A monolayer study and biological and antileishmanial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62(37):9118-27.
166. Piletić MV, Milić BL, Đilas SM. *Organska hemija: Deo 2: Prometej*; 1993.
167. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*. 1990;9(1):1-32.
168. Yildiz F. *Advances in Food Biochemistry*: CRC Press; 2009.
169. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, *α*-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;300(2):535-43.
170. Padayatty SJ, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*. 2001;164(3):353-5.
171. Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR. Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocrine Research*. 2004;30(4):871-5.
172. Rumsey SC, Levine M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1998;9(3):116-30.
173. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(30):18982-9.
174. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*: OUP Oxford; 2007.
175. Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, Walsh SA, Higashikubo R, Buettner GR, et al. Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced cytotoxicity and

- oxidative stress in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(6):4254-63.
176. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000;355(9210):1179-80.
177. Bijur GN, Briggs B, Hitchcock CL, Williams MV. Ascorbic acid-dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1999;33(2):144-52.
178. Lenton KJ, Therriault H, Fülöp T, Payette H, Wagner JR. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*. 1999;20(4):607-13.
179. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*. 1998;392(6676):559.
180. Crott JW, Fenech M. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis *ex vivo*. *Carcinogenesis*. 1999;20(6):1035-41.
181. Antunes LM, Takahashi CS. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation research*. 1998;419(1-3):137-43.
182. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;475(1-2):7-20.
183. Scarpa M, Stevanato R, Viglino P, Rigo A. Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258(11):6695-7.
184. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology*. 1990;186:1-85.
185. Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: Evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;381(2):253-63.
186. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*. 2000;108(8):652-9.
187. Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA. Ascorbic acid prevents 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the

behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT. *Synapse*. 2001;40(1):55-64.

188. Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B, et al. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;246(1):293-8.

189. Premkumar K, Bowlus CL. Ascorbic Acid Does Not Increase the Oxidative Stress Induced by Dietary Iron in C3H Mice. *Journal of Nutrition*. 2004;134(2):435-8.

190. Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*. 2011;13(1):43-52.

191. Lonostro P, Capuzzi G, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A, Vincieri FF. Self-assembling and antioxidant activity of some vitamin C derivatives. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2000;167(1-2):83-93.

192. Liu ZQ, Ma LP, Liu ZL. Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998;95(1):49-57.

193. Rao CV, Rivenson A, Kelloff GJ, Reddy BS. Chemoprevention of azoxymethane-induced colon cancer by ascorbylpalmitate, carbenoxolone, dimethylfumurate and p-methoxyphenol in male F344 rats. *Anticancer Research*. 1995;15(4):1199-204.

194. Ross D, Mendiratta S, Qu ZC, Cobb CE, May JM. Ascorbate 6-palmitate protects human erythrocytes from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;26(1-2):81-9.

195. May JM, Qu ZC, Cobb CE. Accessibility and reactivity of ascorbate 6-palmitate bound to erythrocyte membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;21(4):471-80.

196. Loyd DO, Lynch SM. Lipid-soluble vitamin C palmitate and protection of human high-density lipoprotein from hypochlorite-mediated oxidation. *International Journal of Cardiology*. 2011;152(2):256-7.

197. Austria R, Semenzato A, Bettero A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997;15(6):795-801.

198. Duduković A. *Osnovi i operacije prenosa mase*: Akademska misao; 2008.

199. Fogler HS. *Elements of Chemical Reaction Engineering*: Prentice Hall PTR; 2006.

200. Rao DG. *Introduction to Biochemical Engineering*: Tata McGraw-Hill; 2010.

201. Riet K, Tramper J. *Basic Bioreactor Design*: Taylor & Francis; 1991.

202. Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 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):589-93.
203. Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000;68(6):594-601.
204. Gòdia F, Solà C. Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnology Progress*. 1995;11(5):479-97.
205. Upadhyay SN, Tripathi G. Liquid-phase mass transfer in fixed and fluidized beds of large particles. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1975;20(1):20-6.
206. Tournie P, Laguerie C, Couderc JP. Mass transfer in a liquid fluidized bed at low Reynolds numbers. *Chemical Engineering Science*. 1977;32(10):1259-61.
207. Bošković N, Grbavčić ŽB, Vuković DV, Marković-Grbavčić M. Mass transfer between fluid and immersed surfaces in liquid fluidized beds of coarse spherical inert particles. *Powder Technology*. 1994;79(3):217-25.
208. http://www.damocos.co.kr/damo/language/english/lab_paper3.php.
209. Hernandez K, Garcia-Galan C, Fernandez-Lafuente R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;49(1):72-8.
210. Banjanac K. Ispitivanje uticaja hidrofobnosti površine nosača na aktivnost lipaze imobilisane na nano-SiO₂ čestice. Beograd, Srbija, Tehnološko metalurški fakultet: Univerzitet u Beogradu; 2013.
211. Jakovetić SM, Jugović BZ, Gvozdenović MM, Bezbradica DI, Antov MG, Mijin DZ, et al. Synthesis of aliphatic esters of cinnamic acid as potential lipophilic antioxidants catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013;170(7):1560-73.
212. Stojanović MM, Carević MB, Mihailović MD, Knežević-Jugović ZD, Petrović SD, Bezbradica DI. Enzymatic synthesis and application of fatty acid ascorbyl esters. *Hemijaska Industrija*. 2013;67(2):239-47.
213. Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, Matsuno R. Condensation of L-Ascorbic Acid and Medium-Chain Fatty Acids by Immobilized Lipase in Acetonitrile with Low Water Content. *Food Science and Technology Research*. 1999;5(2):188-92.

214. The Dow Chemical Company M, TX, USA, (<http://www.dow.com>).
215. Song QX, Wei DZ, Zhou WY, Xu WQ, Yang SL. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of L-ascorbyl oleate and L-ascorbyl linoleate. *Biotechnology Letters*. 2004;26(23):1777-80.
216. Chamouleau F, Coulon D, Girardin M, Ghou M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. 2001;11(4-6):949-54.
217. Chen JP. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996;82(4):404-7.
218. Ognjanovic N, Bezbradica D, Knezevic-Jugovic Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology*. 2009;100(21):5146-54.
219. Salis A, Pinna M, Monduzzi M, Solinas V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology*. 2005;119(3):291-9.
220. Zaks A, Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(17):8017-21.
221. Valivety RH, J. Halling P, Macrae AR. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*. 1992;1118(3):218-22.
222. Cochran WG, Cox GM. *Experimental designs*. Njujork, SAD: John Wiley & Sons Inc.; 1957.
223. Hamsaveni DR, Prapulla SG, Divakar S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry*. 2001;36(11):1103-9.
224. Chiang WD, Chang SW, Shieh CJ. Studies on the optimized lipase-catalyzed biosynthesis of *cis*-3-hexen-1-yl acetate in *n*-hexane. *Process Biochemistry*. 2003;38(8):1193-9.
225. Martinek K, Semenov AN, Berezin IV. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. *BBA - Enzymology*. 1981;658(1):76-89.
226. Monot F, Borzeix F, Bardin M, Vandecasteele JP. Enzymatic esterification in organic media: Role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991;35(6):759-65.

227. Stojaković SB, Bezbradica DI, Mijin DZ, Knežević ZD, Šiler-Marinković SS. The effects of Zeolite and silica gel on synthesis of amyl isobutyrate catalyzed by Lipase from *Candida Rugosa*. *Hemijska Industrija*. 2008;62(2):64-8.
228. Hari Krishna S, Divakar S, Prapulla SG, Karanth NG. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Biotechnology*. 2001;87(3):193-201.
229. Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Baba T, Ooguri T, Moriyama S, et al. Ethyl esterification of docosahexaenoic acid in an organic solvent-free system with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001;92(1):19-23.
230. Zhang DH, Li C, Xie LL, Yuwen LX. Enzymatic synthesis of l -ascorbyl laurate in DMSO-acetone mixed solvent. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2013;52(34):11875-9.
231. Godoy CA, de las Rivas B, Bezbradica D, Bolivar JM, López-Gallego F, Fernandez-Lorente G, et al. Reactivation of a thermostable lipase by solid phase unfolding/refolding. Effect of cysteine residues on refolding efficiency. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;49(4):388-94.
232. Jiménez MJ, Esteban L, Robles A, Hita E, González PA, Muñío MM, et al. Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at *sn*-2 position by lipase-catalyzed acidolysis. *Biochemical Engineering Journal*. 2010;51(3):172-9.
233. Bezbradica D, Mijin D, Šiler-Marinković S, Knežević Z. The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2006;38(1):11-6.
234. Garcia T, Sanchez N, Martinez M, Aracil J. Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999;25(7):584-90.
235. Arcos JA, Hill CG, Otero C. Kinetics of the lipase-catalyzed synthesis of glucose esters in acetone. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001;73(2):104-10.
236. Pleiss J, Fischer M, Schmid RD. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998;93(1-2):67-80.
237. Paiva AL, Balcão VM, Malcata FX. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;27(3-5):187-204.

238. Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit[®] C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000;10(1-3):157-76.
239. Boller T, Meier C, Menzler S. EUPERGIT[®] oxirane acrylic beads: How to make enzymes fit for biocatalysis. *Organic Process Research and Development*. 2002;6(4):509-19.
240. Knezevic Z, Milosavic N, Bezbradica D, Jakovljevic Z, Prodanovic R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit[®] C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*. 2006;30(3):269-78.
241. Ivanov AE, Schneider MP. Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1997;3(6):303-9.
242. Mateo C, Fernández-Lorente G, Abian O, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*. 2000;1(4):739-45.
243. Rodrigues ÁR, Cabral JMS, Taipa MÂ. Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragit S-100: Coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(1-2):133-41.
244. Bernal C, Illanes A, Wilson L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: Application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*. 2014;30(12):3557-66.
245. Cao S, Fang L, Zhao Z, Ge Y, Piletsky S, Turner APF. Hierarchically structured hollow silica spheres for high efficiency immobilization of enzymes. *Advanced Functional Materials*. 2013;23(17):2162-7.
246. Cipolatti EP, Silva MJA, Klein M, Feddern V, Feltes MMC, Oliveira JV, et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014;99:56-67.
247. Cruz JC, Pfromm PH, Rezac ME. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. *Process Biochemistry*. 2009;44(1):62-9.
248. Würges K, Pfromm PH, Rezac ME, Czermak P. Activation of subtilisin Carlsberg in hexane by lyophilization in the presence of fumed silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005;34(1-6):18-24.

249. Simon A, Cohen-Bouhacina T, Porté MC, Aimé JP, Baquey C. Study of two grafting methods for obtaining a 3-aminopropyltriethoxysilane monolayer on silica surface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2002;251(2):278-83.
250. <http://www.purolite.com/default.aspx?RelID=619281>.
251. <http://www.purolite.com/default.aspx?RelID=619395>.
252. Séverac E, Galy O, Turon F, Pantel CA, Condoret JS, Monsan P, et al. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011;48(1):61-70.
253. Green D, Perry R. *Perry's Chemical Engineers' Handbook, Eighth Edition*: McGraw-Hill Education; 2007.
254. McCabe WL, Smith J, Harriott P. *Unit Operations of Chemical Engineering*: McGraw-Hill Education; 2005.
255. Jakovetić SM, Luković ND, Bošković-Vragolović NM, Bezbradica DI, Picazo-Espinosa R, Knezevic-Jugovic ZD. Comparative study of batch and fluidized bed bioreactors for lipase-catalyzed ethyl cinnamate synthesis. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2013;52(47):16689-97.
256. Saponjić S, Knežević-Jugović ZD, Bezbradica DI, Zuza MG, Saied OA, Bosković-Vragolović N, et al. 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).
257. Wilke CR, Chang P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE Journal*. 1955;1(2):264-70.
258. Yadav GD, Dhoot SB. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;57(1-4):34-9.
259. Sun J, Jiang Y, Zhou L, Gao J. Optimization and kinetic study of immobilized lipase-catalyzed synthesis of ethyl lactate. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2010;28(4):279-87.
260. Clark DS, Blanch HW. *Biochemical Engineering, Second Edition*: Taylor & Francis; 1995.
261. Matyka M, Khalili A, Koza Z. Tortuosity-porosity relation in porous media flow. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2008;78(2).
262. Cheng NS. Wall effect on pressure drop in packed beds. *Powder Technology*. 2011;210(3):261-6.

263. Bird RB, Stewart WE, Lightfoot EN. Transport Phenomena: Wiley; 2007.
264. Sowana DD, Williams DRG, Dunlop EH, Dally BB, O'Neill BK, Fletcher DF. Turbulent shear stress effects on plant cell suspension cultures. *Chemical Engineering Research and Design*. 2001;79(8):867-75.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Ćorović (rođena Stojanović) rođena je u Kruševcu gde je završila osnovnu školu Dositej Obradović i Kruševačku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine. U toku studija, dva puta joj je dodeljena nagrada „Panta S. Tutundžić“ za postignut izuzetan uspeh. U periodu od 1. jula do 31. avgusta 2008. godine pohađala je IAESTE praksu u Frajbergu u Nemačkoj. Primila je priznanje Srpskog hemijskog društva za ukupan izuzetan uspeh u toku studiranja. Diplomirala je na TMF-u, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 24.09.2010. sa ocenom na diplomskom radu 10 i prosečnom ocenom studiranja 9,69. Po završetku redovnih studija, 13.10.2010. godine je upisala doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (mentor dr Dejan Bezbradica).

Od 1.02.2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Tehnološko-metalurškom fakultetu na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. III 46010 pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 26.02.2013. godine. Koautor je 9 radova u međunarodnim časopisima (pet M21, jedan M22 i tri M23) i dvanaest saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (jedan M33, šest M34, četiri M63 i jedan M64).

Položila je sve ispite predviđene planom i program poslediplomskih studija Tehnološko-metalurškog fakulteta sa prosečnom ocenom 9,82, uključujući i završni ispit.

IZJAVA O AUTORSTVU

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а МАРША БОРОВИЋ (РОЂЕНА СТОЈАНОВИЋ)
број индекса 4020/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

СИНТЕЗА МИПОСЛУБИЛНИХ АСКОРБИЛ-ЕСТЕРА КАРБОКСИЛНИХ
КИСЕЛИНА КАТАЛИЗОВАНА ИМОБИЛИСАНИМ ЛИПАЗАМА

- 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, 1.8.2015.

Марша Соковић

IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора МАРИЈА БОРОВИЋ (РОЗЕНА СТАЈАНОВИЋ)
Број индекса 4020/2010
Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА
Наслов рада СИНТЕЗА ЛИПОСОЛУБИЛИХ АСКОРВИЛ-ЕСТАРА КАРБОКСИЛНИ
КИСЕЛИНА КАТАЛИЗОВАНА ИМОБИЛИСАНИМ ЛИТАЗАМА
Ментор ДР ДЕЈАН БЕЗБРАДИЋА

Потписани/а МАРИЈА БОРОВИЋ

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, 1.8.2015.

Марија Борковић

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

СИНТЕЗА НЕПОСОЛУБЛИЛИХ АСКОРБИЛ-ЕСТЕРА (АРЪДЖСАЛТИХ
КИСЕЛИНА КАТАЛИЗОВАНА ШОБИЛИСАНИМ МИТАЗАМА

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, 1.8.2015.

Neelija Conovic