

Optimizacija esterifikacione aktivnosti lipaze iz *Candida rugosa* imobilisane mikrotalasnim zračenjem

Mladen D. Mihailović, Zorica D. Knežević-Jugović, Dušan Ž. Mijin, Dejan I. Bezbradica

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, , Beograd, Srbija

Izvod

Lipaze su enzimi koji imaju široku primenu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. U industrijskoj praksi primenjuju se imobilisane lipaze jer se imobilizacijom povećava njihova stabilnost i ekonomičnost enzimskih postupaka. U ovom radu optimizovana je imobilizacija lipaze iz *C. rugosa* na komercijalni nosač Eupergit® pomoću mikrotalasnog zračenja. Vreme izlaganja mikrotalasima i molaritet korišćenog pufera optimizovani su sa ciljem dobijanja imobilizata maksimalne aktivnosti. Radi optimizovanja reakcije sinteze amil-izobutirata, pomoću centralnog kompozitnog rotabilnog plana ispitan je uticaj četiri reakciona faktora. Ustanovljeno je da su optimalni uslovi sinteze estra temperatura 50 °C, početna koncentracija imobilisanog enzima 220 mg ml⁻¹, koncentracija dodate vode 0,1% i molarni odnos supstrata 2,5.

Ključne reči: mikrotalasi, Eupergit®, imobilizacija, lipaza.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Lipaze (triacilglicerol acilhidrolaze E.C. 3.1.1.3.) su enzimi koji katalizuju veliki broj reakcija na granici hidrofobne i hidrofilne faze. Lipaze imaju značajnu ulogu u metabolizmu lipida zbog čega su veoma rasprostranjeni u prirodi. Mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog porekla. Trenutno, najveći biotehnološki značaj imaju lipaze mikrobiološkog porekla, zbog niza prednosti u odnosu na lipaze biljnog i animalnog porekla [1]. Zbog svojih karakteristika, lipaze imaju široku primenu u industriji. Enzimski postupci sinteze koji se primenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, imaju sve veći značaj jer se svrstavaju u „zelene“ postupke i dobijeni proizvodi mogu da dobiju etiketu prirodnog proizvoda [2]. Neke od reakcija u kojima lipaze nalaze primenu su reakcije hidrolize [3], transesterifikacije [4], sinteza estara [5,6], razdvajanje optički aktivnih izomera [7]. Za industrijsku primenu lipaza od velikog značaja je mogućnost imobilizacije, pri čemu se imobilizacija najčešće vrši kovalentnim vezivanjem lipaze na nosač, adsorpcijom i smeštanjem u polimerne nosače [8]. Ipak, najveću termostabilnost i aktivnost pokazuju lipaze vezane kovalentnim vezama na nosač [9,10], a samim tim su i najčešće korišćene u industrijskim uslovima. Najveća prednost imobilizacije enzima je u tome što se dobija visoko specifičan katalizator koji se može upotrebiti više puta, a iz reakcione smeše se može lako izdvojiti, filtriranjem ili centrifugiranjem [11]. Ipak, najveći nedostatak ovog postupka je pad enzimske aktivnosti pri samom postupku imobilizacije, kao i

potreba da se u nekim slučajevima izvrši prethodna aktivacija nosača [12,13].

Kao povoljan način imobilizacije pokazala se i imobilizacija lipaze na nosač pomoću mikrotalasnog zračenja. Pokazalo se da se aktivnost lipaze povećava [14–17] kako u reakciji hidrolize tako i u reakciji esterifikacije [18,19]. Posebna povoljnost pri imobilizaciji pomoću mikrotalasnog zračenja je drastično skraćanje vremena trajanja imobilizacije. Sam mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali se ukupni efekat mikrotalasa može pripisati kako termalnom, tako i netermalnom efektu. Veliki značaj pri ovom načinu imobilizacije ima i aktivnost vode [19].

U prethodnim istraživanjima ustanovljeno je da lipaza iz *C. rugosa* može da se imobilizuje na komercijalne nosače Eupergit®C i Eupergit®C 250L pomoću mikrotalasnog zračenja u postupku koji traje samo 3 min [20]. Tako dobijeni uzorci korišćeni su za ispitivanje lipolitike i esterifikacione aktivnosti imobilisane lipaze. Rezultati su pokazali da se vreme imobilizacije drastično skraćuje sa 48 h na svega nekoliko minuta. Takođe je pokazano da je, nasuprot činjenici da je vezana manja količina enzima (do 29%) nego konvencionalnim postupkom imobilizacije, aktivnost lipaze imobilisane pomoću mikrotalasa nešto veća, kao i da dolazi do blagog povećanja aktivnosti imobilisane lipaze u odnosu na slobodnu. Ovako imobilisana lipaza pokazala je i dobru operativnu stabilnost pri reakciji esterifikacije, s obzirom na to da je korišćena u 9 ciklusa pre nego što je aktivnost pala ispod 50% početne aktivnosti imobilizata [20].

S obzirom na rezultate postignute u prethodnim istraživanjima, može se zaključiti da imobilizacija pomoću mikrotalasnog zračenja može naći širu primenu od konvencionalnih metoda imobilizacije. U ovom radu ispitan je uticaj reakcionih uslova na reakciju esterifikacije li-

NAUČNI RAD

UDK 544.473:577.15:66

Hem. Ind. 66 (1) 9–19 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND110720060M

Prepiska: D. Bezbradica, Tehnološko–metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd.

E-pošta: dbez@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 20. jul, 2011

Rad prihvaćen: 7. septembar, 2011

pazom iz *C. rugosa* imobilisane na komercijalne nosače pomoću mikrotalasnog zračenja. Kao nosači korišćeni su Eupergit®C i Eupergit®C 250L – polimerni nosači dobijeni kopolimerizacijom *N,N*-metil-bis(metakrilamida), glicidilmetakrilata, alil glicidil etra i metakrilamida. Ovi nosači su veoma pogodni za industrijsku primenu, a zbog dobre hemijske i mehaničke stabilnosti mogu se primeniti na različite reaktorske konfiguracije. Navedeni nosači vezuju enzim bez predhodne modifikacije, gradeći kovalentne veze preko epoksidnih grupa, a ovako vezan enzim pokazuje veliku stabilnost u poređenju sa enzimima vezanim na druge komercijalne nosače [21–23]. Imobilisana lipaza korišćena je u reakciji sinteze amil-izobutirata. Prilikom imobilizacije dolazi do promene konfiguracije enzima kao i promena u sastavu mikrookoline enzima, pa je neophodno ispitati uticaj različitih faktora na reakciju sinteze estara. Glavni cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj 4 eksperimentalna faktora na reakciju sinteze estera primenom statističkih metoda. Primenom centralnog kompozitnog rotatabilnog eksperimentalnog plana izbegnuta je primena komplikovane i delom nepouzdanе konvencionalne metode ispitivanja uticaja reakcionih faktora koja podrazumeva veliki broj eksperimenata, a dobijeni rezultati ne daju sliku o međusobnoj interakciji pojedinačnih reakcionih faktora.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijali

Kao biokatalizator u ovom radu korišćena je lipaza iz *C. rugosa*, proizvod kompanije Sigma, St. Louis, SAD. Nosači korišćeni za imobilizaciju, Eupergit®C i Eupergit®C 250L, komercijalni su nosači kompanije Röhm Pharma Polymers, Darmsdadt, Nemačka. Kao standard za određivanje sadržaja proteina korišćen je rastvor albumina iz goveđeg seruma – BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD). Za sintezu estera korišćeni su amil-alkohol (Lachema, Neratovice, Republika Češka) i izobuterna kiselina (Farmaitalia Carlo Erba, Milano, Italija). Kao rastvarač korišćen je izooktan (Riedel-de-Haën, Nemačka).

Metode

Imobilizacija enzima

Imobilizacija lipaze iz *C. rugosa* izvršena je pomoću mikrotalasnog zračenja. Kao što je u uvodnom delu rečeno, imobilizacija se vrši formiranjem kovalentne veze enzim–nosač, direktno preko epoksidnih grupa nosača. Uzorak je pripremljen tako što je u balonu sa šlifovanim zatvaračem odmereno 500 mg nosača i dodato 75 ml rastvora lipaze (koncentracije 1 mg ml⁻¹) u fosfatnom puferu (koncentracije 1 mol dm⁻³, pH 7,0). Ovako pripremljeni uzorci izlažu se mikrotalasnom zračenju snage 100 W, u mikrotalasnoj pećnici (Samsung M182DN, Port Klang, Malezija). Vreme izlaganja mikrotalasima varirano je u intervalu od 1 do 4 min. Takođe je pri-

premljen i uzorak koji je mikrotalasnom zračenju bio izložen 2 min, zatim ohlađen na sobnu temperaturu i ponovo izložen mikrotalasnom zračenju u toku 2 min. Temperatura uzorka tokom imobilizacije je merena pomoću IR termometra (Ebro TN4088LC, Ebro electronics GmbH&Co. KG, Nemačka), a beležena je maksimalna postignuta temperatura. Nakon reakcije, imobilizat je izdvojen na vakuum filteru, ispran fosfatnim puferom (3×10 ml pufera koncentracije 1 mol dm⁻³, pH 7,0), a zatim osušen na sobnoj temperaturi tokom 12 h.

Određivanje koncentracije vezanog enzima

Uzorci standardnog rastvora lipaze koncentracija u opsegu od 0,05 do 0,5 mg ml⁻¹ dobijeni su razblaživanjem osnovnog rastvora lipaze koncentracije 1 mg ml⁻¹. Ovako pripremljeni uzorci korišćeni su za određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju [24]. Kao standard pri određivanju sadržaja proteina korišćen je rastvor albumina iz goveđeg seruma (BSA). Step en imobilizacije određivan indirektno, primenom Lorijevog metoda za određivanje proteina iz rastvora filtrata zaoostaloga nakon izdvajanja imobilizata. Na bazi dobijenog rezultata izračunata je masa proteina u filtratu, a masa vezanog enzima izračunata je kao razlika između mase enzima unete u imobilizaciju i mase enzima u filtratu, i izražena je po masi suvog nosača. Step en imobilizacije izražen je kao procenat vezanog enzima.

Enzimski katalizovana sinteza estera

Sinteza estera izvođena je u balonu sa šlifovanim zatvaračem (100 ml). Reakciona smeša se sastoji od prethodno pripremljenih i osušenih imobilizata, 5 µl vode i po 1,25×10⁻³ mol amil-alkohola i izobuterne kiseline. Ovako pripremljena reakciona smeša dopunjena je izooktanom do 5 ml i smeštena je na termostatirano vodeno kupatilo sa mešanjem na 45 °C i 150 obrtaja/min tokom 48 h. Ovi uslovi su ranije ustanovljeni kao optimalni za datu reakciju [25] i kao takvi primenjeni su u prvom nizu eksperimenata ovog rada. Reakcija je nakon 48 h prekidana dodatkom smeše etanola i dietil etra. Tok reakcije praćen je titracijom uzorka rastvorom NaOH koncentracije 0,1 mol dm⁻³ u prisustvu fenolftaleina kao indikatora. Razlika u utrošku NaOH pojedinačnih uzoraka i slepe probe koristi se za računanje stepena konverzije, tj. prinosa estera izraženog kao µmol proizvoda po 1 g suvog nosača i minuti. Da bi bila ispitana ispravnost ove metode, nasumično odabrani uzorci su ispitani i pomoću gasne hromatografije (GC). Korišćen je gasni hromatograf Varian 3400 opremljen DB-1 kapilarnom kolonom dimenzija 30 m×0,256 mm, debljine filma 1,25 µm (J&W Scientific, Folsom, SAD), plamenno jonizujućim detektorom i S/SL staklenim injektorom (1071 kapilarni injektor). Primenjen je sledeći temperaturni režim: početna temperatura kolone 60 °C, početno vreme zadržavanja 1,0 min, krajnja temperatura kolone 240 °C uz interval zagrevanja 5 °C min⁻¹,

krajnje vreme zadržavanja 10,0 min. Kao noseći gas korišten je azot pri protoku 1 ml min^{-1} , temperatura injektora $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, odnos razdeljivanja 1:60, temperatura detektora $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, atenuacija 1 i opseg $10^{-10}\text{ A mV}^{-1}$. Kako je primenom GC analize ustanovljeno da greška titracione metode manja od 3%, primenjena titraciona metoda se smatra odgovarajućom.

Optimizacija reakcije esterifikacije primenom statističkih metoda

U ovom radu, u sistemu sa imobilisanom lipazom, uticaj četiri eksperimentalna faktora ispitan je pomoću centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana, na pet nivoa vrednosti ispitivanih faktora. Primenjeni eksperimentalni plan uključuje 30 eksperimentalnih tačaka, i to 16 faktorskih, 8 aksijalnih i 6 centralnih. Ispitan je uticaj četiri parametra: početne koncentracije vode, temperature, početne koncentracije imobilisanog enzima i molarog odnosa kiseline i alkohola. U tabeli 1 date su stvarne i kodirane vrednosti ispitivanih faktora, primenjene u eksperimentu.

Eksperimenti su u skladu sa eksperimentalnim planom vođeni nasumičnim redosledom, ne bi li se na taj način eliminisala mogućnost sistemske greške. Odzivna veličina u ovom setu eksperimenata bila je stepen konverzije, tj. prinos estra izražen u procentima u odnosu na teorijski prinos. Dobijeni rezultati modelovani su jednačinom drugog reda koja uključuje članove koji opisuju interakcije između različitih faktora:

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

gde je Y odzivna veličina (prinos estra), β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} i β_{kij} koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijent regresije, redom, a X_i i X_j nezavisne promenljive. Adekvatnost modela je testirana disperzionom analizom modela. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička signifikantnost su određeni metodom najmanjih kvadrata korišćenjem programa Matlab (verzija 7.2). Parametar koji opisuje adekvatnost matematičkog modela određen je Fišerovim testom. Signifikantnost regresionih koeficijenata ispitana je Studentovim testom, a dati koeficijent se smatra signifikantnim ukoliko je za određeni tip koeficijenta (linearni, kvadratni ili interaktivni) vrednost Studentovog testa veća od tablične.

REZULTATI I DISKUSIJA

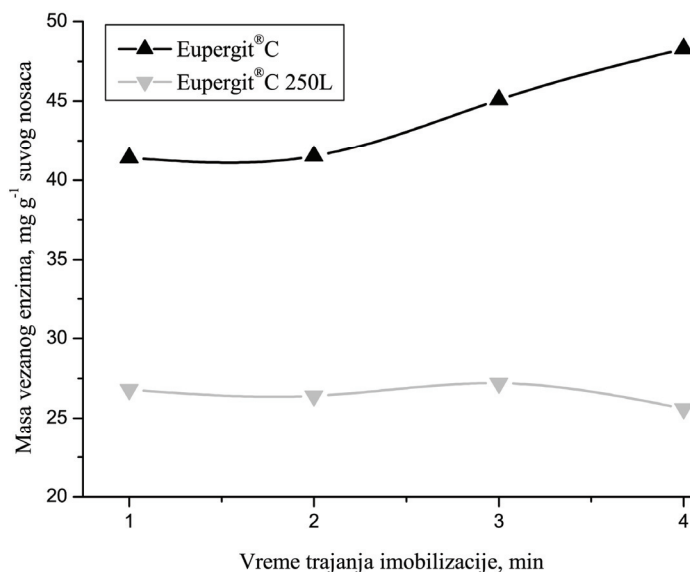
Rezultati imobilizacije enzima pomoću mikrotalasnog zračenja u ranijim radovima ukazuju na to da je ovaj metod imobilizacije perspektivan, kako sa stanovišta samog procesa imobilizacije, tako i sa stanovišta aktivnosti dobijenih imobilizata. U ovom radu biće uporedo prezentovani rezultati imobilizacije na Eupergit®C i Eupergit®C 250L, u zavisnosti od vremena trajanja imobilizacije kao i od molariteta pufera korišćenog pri imobilizaciji. Imobilizati dobijeni u ovoj seriji eksperimenata korišćeni su za reakciju sinteze amil-izobutirata. Na slici 1 dat je uporedni prikaz mase vezane lipaze iz *C. rugosa* na Eupergit®C i Eupergit®C 250L u zavisnosti od vremena izlaganja mikrotalasima.

Kako se sa slike 1 može videti, znatno veća količina lipaze se vezuje u reakcijama u kojima se kao nosač koristi Eupergit®C. Najviše lipaze vezano je na Eupergit®C nakon 4 min izlaganja, 48,3 mg po gramu suvog nosača, dok je najviše enzima na Eupergit®C 250L vezano nakon 3 min, 27,2 mg po gramu suvog nosača. Ovakav rezultat je i očekivan s obzirom na samu prirodu nosača, tj. činjenicu da Eupergit®C sadrži znatno veći broj epoksidnih grupa (oko 600 μmol po gramu suvog nosača) nego Eupergit®C 250L (oko 250 μmol po gramu suvog nosača) [26]. Tokom ove eksperimentalne serije u reakcionoj smeši su zabeležene maksimalne temperature u intervalu od $25,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eupergit®C 250L, 4 min) do $48,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eupergit®C, 4 min).

Kada se detaljnije razmotre rezultati reakcije sinteze amil-izobutirata, zaključuje se da je u slučaju oba nosača najveću aktivnost pokazao uzorak imobilisan tokom 3 min. Iako je masa vezane lipaze na Eupergit®C bila veća u slučaju imobilizacije tokom 4 min, aktivnost ovog uzorka je znatno manja nego za uzorak imobilisan tokom 3 min. Slika 2 daje grafičku ilustraciju esterifikacione aktivnosti lipaze od vremena izlaganju mikrotalasima. Iako se može primetiti da, iako je došlo do povećanog vezivanja enzima na nosač, deo aktivnosti se izgubio, najverovatnije zbog povišenja temperature i posledične promene prostorne konformacije enzima. Izveden je i dodatni eksperiment u kojem je imobilizacija izvedena u dve etape koje su trajale po 2 min, između kojih je uzorak brzo hlađen do postizanja sobne temperature. Na ovaj način se postiže niža temperatura u sudu, te se može sagledati u kojoj meri je smanjenje

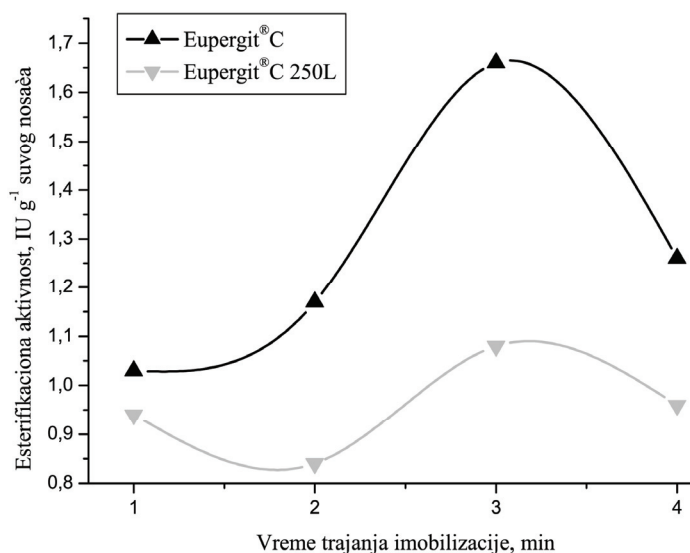
Tabela 1. Kodirane vrednosti za stvarne vrednosti faktora
Table 1. Coded values of Actual values of examined reaction factors

Faktor	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Temperatura, $X_1 / ^{\circ}\text{C}$	25	35	45	55	65
Koncentracija imobilisanog enzima, $X_2 / \text{mg ml}^{-1}$	60	100	140	180	220
Koncentracija vode, $X_3 / \%$	0	0,25	0,5	0,75	1
Molski odnos kiseline i alkohola, X_4	0,5	1	1,5	2	2,5



Slika 1. Uporedni prikaz mase vezane lipaze iz *C. rugosa* na Eupergit®C i Eupergit®C 250L u zavisnosti od vremena izlaganja mikrotalasima.

Figure 1. The effect of time of microwave irradiation on enzyme loading on Eupergit®C and Eupergit®C 250L.



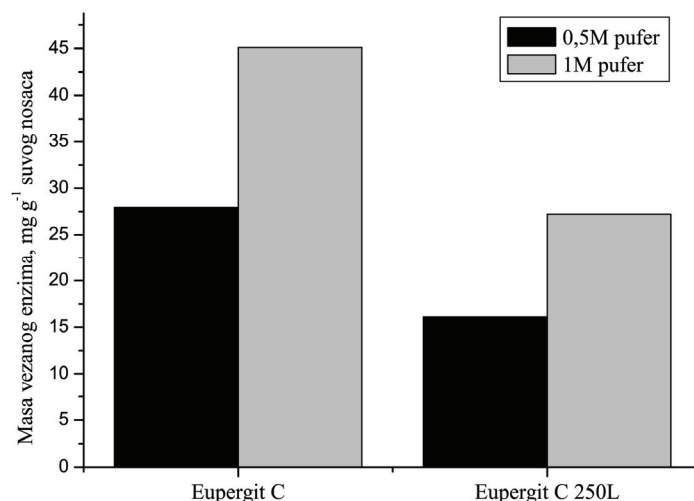
Slika 2. Uporedni prikaz esterifikacione aktivnosti lipaze iz *C. rugosa* imobilisane na Eupergit®C i Eupergit®C 250L u zavisnosti od vremena izlaganja mikrotalasima.

Figure 2. The effect of time of microwave irradiation on bound esterification activity on Eupergit®C and Eupergit®C 250L.

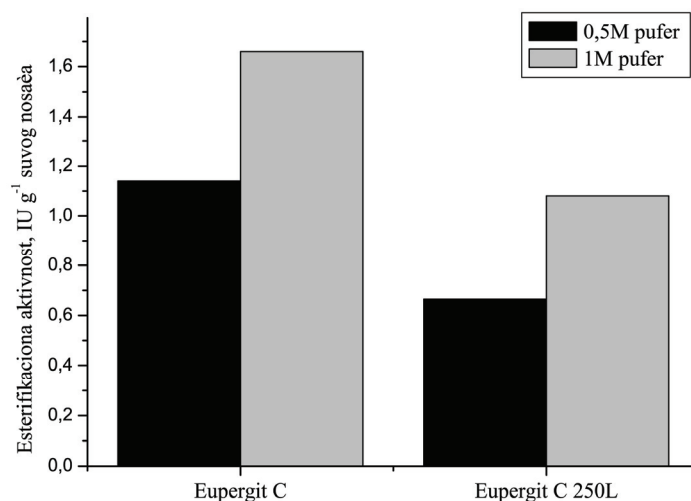
aktivnosti imobilisanog enzima posledica zagrevanja. U ovom eksperimentu vezano je $45,1 \text{ mg g}^{-1}$ lipaze na Eupergit®C, a $24,9 \text{ mg g}^{-1}$ lipaze na Eupergit®C 250L. Postignute esterifikacione aktivnosti su $1,56 \text{ IU g}^{-1}$ u slučaju imobilizacije na Eupergit®C i $0,98 \text{ IU g}^{-1}$ u slučaju imobilizacije na Eupergit®C 250L. Masa vezanog enzima i esterifikaciona aktivnost su u oba slučaja niže od odgovarajućih imobilisanih enzima dobijenih trominutnim tretmanom. Pošto je maksimalna temperatura u toku trominutnih imobilizacija bila čak nešto viša nego u dvostepenom imobilizacionom postupku, može se zaključiti da toplota koja se generiše dejstvom mikrotala-

lasa nije presudna u njihovom inaktivirajućem dejstvu koje nastaje nakon trećeg minuta imobilizacije.

U ranijim radovima, pokazano je da molaritet pufera korišćenog pri imobilizaciji enzima drastično utiče na stepen imobilizacije, ali i na aktivnost imobilizata [26,27]. U ovom radu, ispitan je uticaj molariteta pufera u reakciji imobilizacije lipaze. Upoređen je rezultat dobijen za lipazu imobilisanu pomoću mikrotalasnog zračenja tokom 3 min u 1 M puferu (s obzirom na to da je u prethodnim eksperimentima baš taj imobilizat pokazuje najveću esterifikacionu aktivnost), sa rezultatom dobijenim za lipazu imobilisanu pod istim uslovima, ali u puferu koncentracije $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$. Dobijeni imobili-



Slika 3. Uporedni prikaz mase vezane lipaze na Eupergit®C i Eupergit®C 250L u fosfatnom puferu različitih koncentracija.
Figure 3. The effect of molar concentration of phosphate buffer on enzyme loading on Eupergit®C and Eupergit®C 250L.



Slika 4. Uporedni prikaz esterifikacione aktivnosti lipaze imobilisane na Eupergit®C i Eupergit®C 250L u fosfatnom puferu različitih koncentracija.
Figure 4. The effect of molar concentration of phosphate buffer on esterification activity bound on Eupergit®C and Eupergit®C 250L.

zat upotrebljen je u reakciji esterifikacije. Na slikama 3 i 4 dati su grafički prikazi dobijenih rezultata.

Kao što se sa slike 3 može videti, više lipaze se vezuje na nosač u prisustvu pufera većeg molariteta. Kao što je već pomenuto, ovakav rezultat je očekivan s obzirom na to da sa povećanjem jonske jačine rastvora dolazi i do jačanja hidrofobnih interakcija između nosača i molekula lipaze. I u ovom slučaju lako je uočljivo da se više lipaze vezuje na Eupergit®C.

Na slici 4 uočljivo je da je, sa stanovišta reakcije esterifikacije, povoljnija imobilizacija u puferu većeg molariteta. Ipak, treba naglasiti da je u ranijim radovima pokazano da, zavisno od tipa reakcije koju katališe lipaza, može biti povoljnije imobilizaciju voditi i u puferu manjeg molariteta [20].

Dosadašnji rezultati ukazuju na to da je u reakciji sinteze amil-izobutirata najpovoljnije koristiti lipazu

imobilisanu na Eupergit®C u jednomolarnom puferu, pomoću mikrotalasnog zračenja tokom 3 min. Stoga je u daljem radu lipaza imobilisana upravo na ovaj način korišćena za optimizaciju reakcije esterifikacije pomoću centralnog kompozitnog rotatabilnog eksperimentalnog plana.

Statističke metode omogućavaju da se ispita uticaj nekoliko faktora na određeni proces koristeći relativno mali broj eksperimenata, a da se pri tome dobije i podatak o međusobnoj interakciji pojedinačnih faktora [28–35].

Faktori koji utiču na sintezu estara pomoću slobodne lipaze su temperatura na kojoj se reakcija odigrava, početni molski odnos kiseline i alkohola, početna koncentracija vode kao i početna masa imobilisanog enzima [36]. Stoga je u ovom radu ispitan uticaj ovih faktora i na reakciju katalizovanu imobilisanom lipazu. Uti-

caj eksperimentalnih faktora ispitivan je u sledećim uslovima: temperatura 25–65 °C, početni molski odnos kiseline i baze 0,5–2,5, početna koncentracija vode 0–1% v/v, koncentracija imobilisanog enzima 60–220 mg ml⁻¹.

Reakcije su vođene tokom 48 h na termostatiranom vodenom kupatilu i skladu sa eksperimentalnim planom, a kao odzivna veličina korišćen je stepen konverzije limitirajućeg supstrata. Kompletan eksperimentalni plan, zajedno sa rezultatima pojedinačnih eksperimenata dat je u tabeli 2, a u tabeli su korišćene kodirane vrednosti faktora. Najbolji rezultat (86,3% konverzije limitirajućeg supstrata) postignut je u eksperimentu br. 24, na temperaturi 45 °C, pri koncentraciji dodate vode 0,5%, koncentraciji imobilisanog enzima u reakcionoj smeši 220 mg ml⁻¹ i početnom molskom odnosu kiseline i alkohola 2,5.

Rezultati dobijeni u ovoj eksperimentalnoj seriji fitovani su regresionim modelom drugog reda koji uklju-

čuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora. Adekvatnost regresionog modela je ispitana pomoću Fišerovog testa. S obzirom na to da je vrednost Fišerovog testa (4,278) manja od tablične vrednosti za odgovarajući stepen slobode eksperimentalnog plana, dobijeni regresioni model drugog reda smatra se adekvatnim, tj. može se koristiti za opisivanje uticaja ispitivanih eksperimentalnih faktora. Signifikantnost koeficijenata regresionog modela je ispitana Studentovim testom. Nakon odstranjivanja članova koji nisu statistički signifikantni, dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y = 52,95 + 6,635X_2 + 1,639X_3 + 9,570X_4 - 1,784X_1^2 - 1,135X_3^2 - 2,073X_4^2 - 1,174X_1X_3 + 2,566X_2X_4 \quad (2)$$

Statistička analiza je pokazala da su svi reakcioni faktori značajni. Početna koncentracija enzima nema značajan kvadratni član, te je zavisnost između prinosa

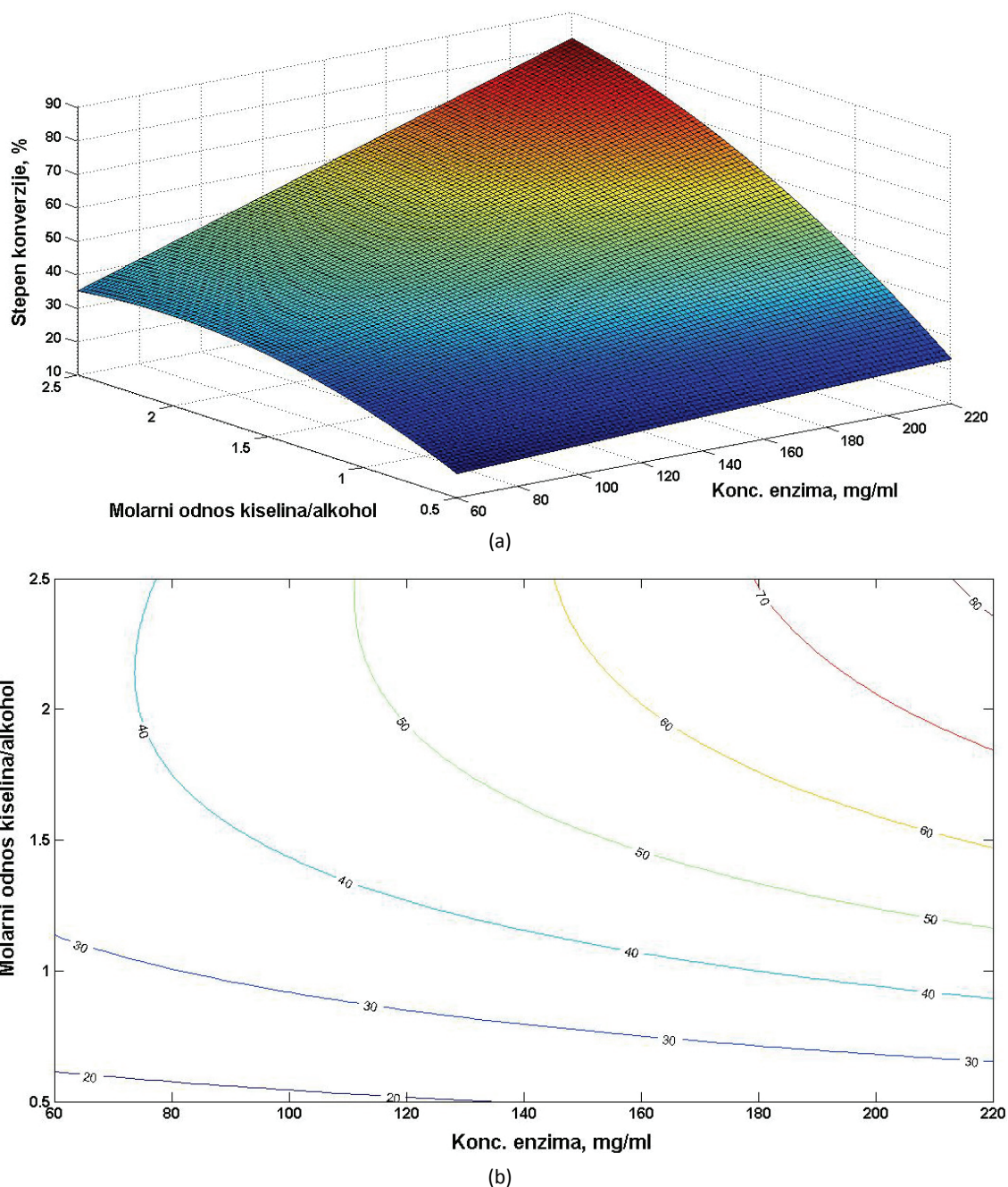
Tabela 2. Eksperimentalni plan i dobijeni rezultati
Table 2. Experimental design and obtained results

Br. eksperimenta	Temperatura X_1	Koncentracija imobilisanog enzima, X_2	Koncentracija vode X_3	Početni molski odnos kiseline i alkohola, X_4	Stepen konverzije, %
1.	-1	-1	-1	-1	29,7
2.	1	-1	-1	-1	36,9
3.	-1	1	-1	-1	38,2
4.	1	1	-1	-1	45,8
5.	-1	-1	1	-1	32,9
6.	1	-1	1	-1	35,3
7.	-1	1	1	-1	39,8
8.	1	1	1	-1	47,8
9.	-1	-1	-1	1	36,5
10.	1	-1	-1	1	45,4
11.	-1	1	-1	1	61,4
12.	1	1	-1	1	64,3
13.	-1	-1	1	1	45,4
14.	1	-1	1	1	52,6
15.	-1	1	1	1	70,7
16.	1	1	1	1	61,0
17.	-2	0	0	0	52,6
18.	2	0	0	0	39,8
19.	0	-2	0	0	38,6
20.	0	2	0	0	61,0
21.	0	0	-2	0	45,8
22.	0	0	2	0	51,8
23.	0	0	0	-2	37,0
24.	0	0	0	2	86,3
25.	0	0	0	0	51,0
26.	0	0	0	0	50,7
27.	0	0	0	0	51,8
28.	0	0	0	0	53,8
29.	0	0	0	0	53,8
30.	0	0	0	0	51,8

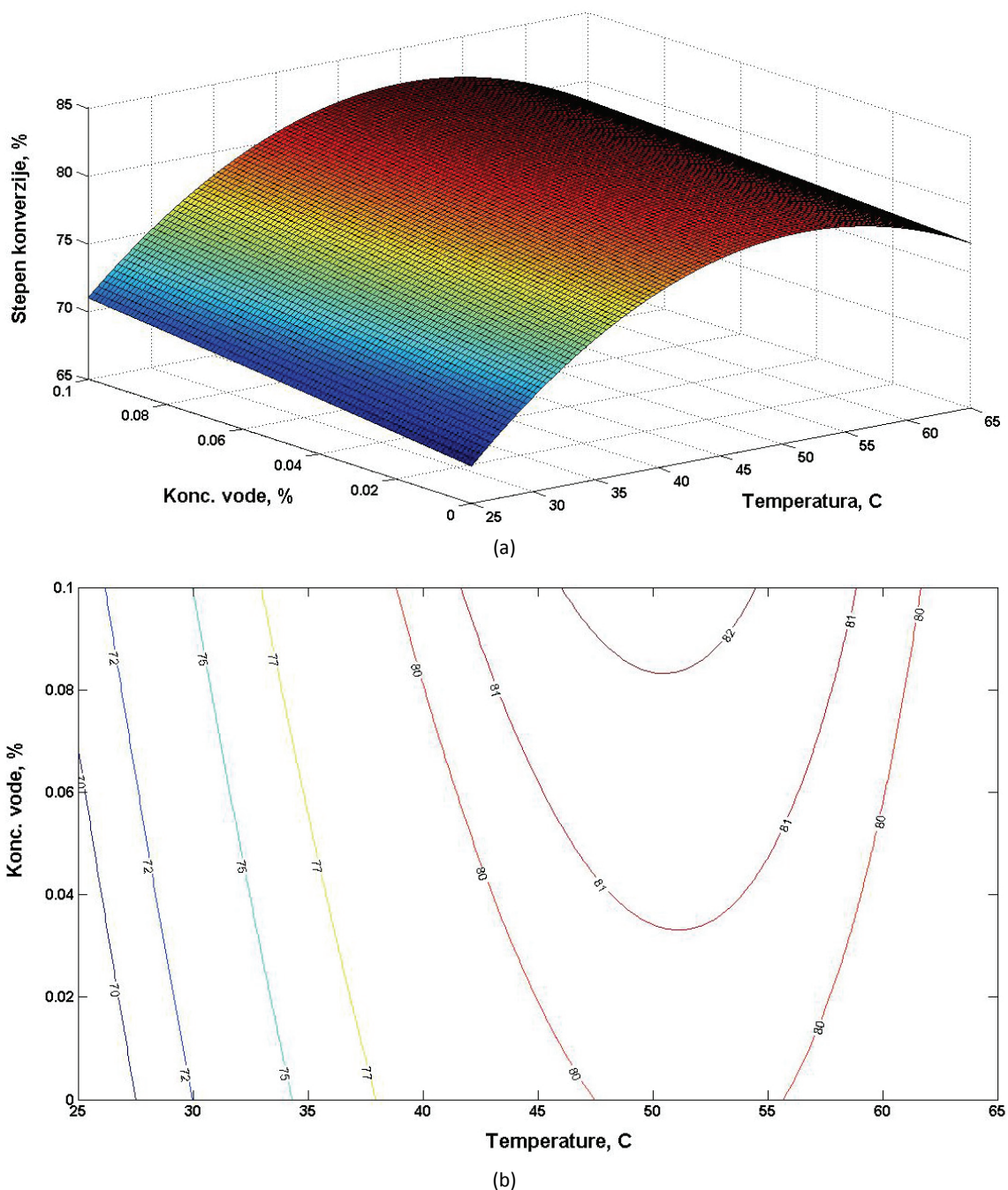
proizvoda i ovog reakcionog faktora linearno rastuća. Ostala tri faktora imaju značajne kvadratne članove koji imaju negativnu vrednost, pa se mogu predstaviti kvadratnim funkcijama sa maksimumom. Poređenjem vrednosti regresionih koeficijenata u jednačini (2), kao i posmatranjem slika 5 i 6, može se uočiti da su faktori sa najvećim uticajem na sintezu amil-izobutirata početni molarni odnos kiseline i alkohola i početna koncentracija imobilisanog enzima, dok temperatura i početna koncentracija vode imaju znatno manji uticaj. Pored toga, signifikantna su i dva koeficijenta interakcije: pozitivne između koncentracije enzima i molarnog odnosa

supstrata (+2,566) i negativne između temperature i koncentracije dodate vode (−1,174).

Na slici 5 prikazan je uticaj molarnog odnosa supstrata i početne koncentracije enzima na stepen konverzije limitirajućeg supstrata. Pozitivna interakcija ova dva faktora lako je uočljiva (slika 5a) pošto se najveći prinos proizvoda postiže pri maksimalnoj koncentraciji enzima i maksimalnom molarnom odnosu supstrata (2,5). Takođe, primetno je da pri najnižoj koncentraciji enzima molarni odnos ima lokalni maksimum na 2,2, ali sa daljim povećanjem koncentracije enzima dolazi i do pomeranja maksimuma van posmatranog opsega. Druga



Slika 5. Odzivne površine (a) i konturni dijagrami (b) uticaja molarnog odnosa supstrata i početne koncentracije enzima. $x_1 = 1$, $x_3 = -1$.
Figure 5. Response surface (a) and contour plots (b) of effects of substrate molar ratio and initial enzyme concentration. $x_1 = 1$, $x_3 = -1$.



Slika 6. Odzivne površine (a) i konturni dijagrami (b) uticaja temperature i početne koncentracije vode. $x_2 = 2$, $x_4 = 2$.
 Figure 6. Response surface (a) and contour plots (b) of effects of reaction temperature and added water concentration. $x_2 = 2$, $x_4 = 2$.

dva faktora, temperatura i početna koncentracija vode ne pokazuju toliko značajan uticaj na prinos estra. Maksimalan prinos estra se postiže pri temperaturi od 50 °C i početnoj koncentraciji vode 0,1%. Interesantno je da je u prethodnim istraživanjima uticaj eksperimentalnih faktora na esterifikaciju pomoću slobodne lipaze [36] temperaturni optimum bio značajno niži (35 °C). Dakle, imobilizacija na Eupergit®C pomoću mikrotalasnog zračenja dovodi do mogućnosti korišćenja lipaze iz *C. rugosa* na višim temperaturama što dovodi i do značajnog

povećanja brzine reakcije. Od velikog je značaja i što koncentracija vode pokazuje vrlo mali efekat na prinos proizvoda (slika 6a) jer je regulisanje koncentracije vode u reakcionoj smeši obično najveća prepreka u razvoju enzimskih postupaka sinteze estara [2,37,38].

ZAKLJUČAK

U ovom radu je pokazano da se lipaza iz *C. rugosa* imobilisana na Eupergit®C pomoću mikrotalasnog zračenja uspešno može primeniti za sintezu amil-izobuti-

rata. Značajno je da se vreme imobilizacije može drastično skratiti sa 48 h, koliko traje imobilizacija konvencionalnim postupcima, na svega nekoliko minuta. Svakako, vreme izlaganja mikrotalasima kao i molaritet pufera u kome se imobilizacija vrši treba prilagoditi tako da se dobije imobilizat najveće esterifikacione aktivnosti. Takođe, u ovom radu je uspešno primenjena statistička metoda za optimizaciju najvažnijih reakcionih faktora. Pokazano je da se sa relativno malim broju eksperimenata može dobiti pouzdan model koji opisuje uticaj reakcionih faktora na reakciju sinteze estera. Ustanovljeno je da su optimalni uslovi za sintezu estera: temperatura 50 °C, početna koncentracija imobilisanog enzima 220 mg ml⁻¹, koncentracija dodate vode 0,1% i molarni odnos supstrata 2,5.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije na finansijskoj podršci (u okviru projekata III 46010 i 172013).

LITERATURA

- [1] N.D. Ognjanović, S.D. Petrović, D.I. Bezbradica, Z.D. Knežević-Jugović, Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela, *Hem. Ind.* **64** (2010) 1–8.
- [2] S.B. Stojaković, D.I. Bezbradica, D.Ž. Mijin, Z.D. Knežević, S. Šiler-Marinković, Uticaj zeolita i silika gela na sintezu amil-izobutirata katalizovanu lipazom iz *Candida rugosa*, *Hem. Ind.* **62** (2008) 64–68.
- [3] C. Albasi, J.P. Riba, V. Bales, Enzymatic hydrolysis of sunflower oil: characterisation of interface, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **69** (1999) 329–336.
- [4] H.M. Chang, H.F. Liao, C.C. Lee, C.J. Shieh, Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80** (2004) 307–312.
- [5] Y.Y. Linko, X.Y. Wu, Biocatalytic production of useful esters by two forms of lipase from *Candida rugosa*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **65** (1999) 163–170.
- [6] D. Mukesh, S. Jadhav, A.A. Banerji, K. Thakkar, H.S. Bevinakatti, Lipase-catalyzed esterification reactions-experimental and modeling studies, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **69** (1999) 179–186.
- [7] S.W. Tsai, B.Y. Liu, C.S. Chang, Enhancement of (S)-naproxen ester productivity from racemic naproxen by lipase in organic solvents, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **65** (1996) 156–162.
- [8] X. Malcata, H. Reyes, H. Garcia, C. Hill, C. Amundson, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipase, *Enzym Microb. Technol.* **14** (1990) 426–446.
- [9] E. Katchalski-Katzir, D.M. Kraemer, Eupergit®C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10** (2000) 157–176.
- [10] F.M. Bautista, M.C. Bravo, J.M. Campelo, A. Garcia, D. Luna, J.M. Marinas, A.A. Romero, Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on amorphous AlPO₄ and other inorganic supports, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72** (1998) 249–254.
- [11] N.Z. Milašinović, M.T. Kalagasidis Krušić, Z.D. Knežević-Jugović, J.M. Filipović, Uticaj sastava poli(*N*-izopropilakrilamida-*ko*-itakonska kiselina)hidrogela na aktivnost imobilisane lipaze iz *Candida rugosa*, *Hem. Ind.* **62** (2008) 339–344.
- [12] J.F. Shaw, R.C. Chang, F.F. Wang, Y.J. Wang, Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials, *Biotechnol. Bioeng.* **35** (1990) 132–137.
- [13] A. Kilinc, S. Önal, A. Telefoncu, Chemical attachment of porcine pancreatic lipase to crosslinked poly(vinyl alcohol) by means of adipoyldichloride, *Process. Biochem.* **38** (2002) 641–647.
- [14] P. Nahar, U. Bora, Microwave-mediated rapid immobilization of enzymes onto an activated surface through covalent bonding, *Anal. Biochem.* **328** (2004) 81–83.
- [15] I. Roy, M.N. Gupta, Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification, *Tetrahedron* **59** (2003) 5431–5436.
- [16] S. Zhu, Y. Wu, Z. Yu, X. Zhang, H. Li, M. Gao, The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw, *Bioresource Technol.* **97** (2006) 1964–1968.
- [17] G. Yadav, A. Sajgure, S. Dhoot, Insight into microwave irradiation and enzyme catalysis in enantioselective resolution of *RS*-(±)-methyl mandelate, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83** (2008) 1145–1153.
- [18] G. Yadav, P. Lahti, synergism between microwave and enzyme catalysis in intensification of reactions and selectivities: transesterification of methyl acetoacetate with alcohols, *J. Mol. Catal. B: Chem.* **223** (2004) 51–56.
- [19] M.C. Parker, T. Besson, S. Lamare, M.D. Legoy, Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media, *Tetrahedron Lett.* **37** (1996) 8383–8386.
- [20] D. Bezbradica, D. Mijin, M. Mihailović, Z. Knežević-Jugović, Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®C supports, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 1642–1648.
- [21] B. Wirz, R. Barner, J. Huebscher, Facile chemoenzymic preparation of enantiomerically pure 2-ethylglycerol derivatives as versatile trifunctional C₄-synthons, *J. Am. Chem. Soc.* **58** (1993) 3980–3984.
- [22] A.E. Ivanov, M.P. Schneider, Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis, *J. Mol. Catal., B* **3** (1997) 303–309.
- [23] Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, R. Prodanović, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®C supports by covalent attachment, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269–278.
- [24] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin reagent, *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265–275.
- [25] D. Bezbradica, D. Mijin, S. Šiler-Marinković, Z. Knežević, The *Candida rugosa* lipase-catalyzed synthesis of amyl-isobutirata in organic solvent and solvent free system: a kinetic study, *J. Mol. Catal., B* **38** (2006) 11–16.
- [26] M. Hernaiz, D.H.G. Crout, Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β-galactosidase from *B. circulans*

- and an α -galactosidase from *aspergillus oryzae*, *Enzyme Microb. Technol.* **27** (2000) 26–32.
- [27] M.T. Martin, F.J. Plou, M. Alcade, A. Balestros, Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **21** (2003) 299–308.
- [28] D.R. Hamsaveni, S.G. Prapulla, S. Divakar, Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate, *Process Biochem.* **36** (2001) 1103–1109.
- [29] K.R. Kiran, B. Manohar, N.G. Karanth, S. Divakar, Response surface methodological study of esterification of lactic acid with palmitic acid catalyzed by immobilized lipases from *Mucor miehei* and porcine pancreas, *Eur. Food Res. Technol.* **211** (2000) 130–135.
- [30] E.I. Soo, A.B. Saleh, M. Basri, R.N.Z.A. Rahman, K. Kamaruddin, Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants, *Process Biochem.* **39** (2004) 1511–1518.
- [31] S. Ferreira-Dias, A.C. Correia, M.M.R. de Fonseca, Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partialglycerides, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **21** (2003) 71–80.
- [32] C.J. Shieh, S.W. Chang, Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in *n*-hexane by response surface methodology, *J. Agric. Food. Chem.* **49** (2001) 1203–1207.
- [33] M. Elibol, D. Ozer, Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochem.* **38** (2002) 367–372.
- [34] C.M.L. Carvalho, M.L.M. Serralheiro, J.M. Cabral, M.R. Aires-Barros, Application of factorial design on the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles, *Enzyme Microb. Technol.* **21** (1997) 117–123.
- [35] N. Senanayake, F. Shahidi, Lipase-catalyzed incorporation of docosahexanoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology, *Food. Chem.* **77** (2002) 115–123.
- [36] Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, S. Branković-Dimitrijević, D. Mijin, Lipase catalyzed synthesis of flavor esters in non-aqueous media: Optimization of the yield of pentyl 2-methylpropanoate by statistical analysis, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 1139–1151.
- [37] J. Giacometti, F. Giacometti, Č. Milin, Đ. Vasić-Rački, Kinetic characterisation of enzymatic esterification in a solvent system: adsorptive control of water with molecular sieves, *J. Mol. Catal., B* **11** (2001) 921–928.
- [38] F. Monot, M. Borzeix, M. Bardin, P. Vandecasteele, Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis, *Appli. Microbiol. Biotechnol.* **35** (1991) 759–765.

SUMMARY

OPTIMIZATION OF ESTERIFICATION ACTIVITY OF LIPASE FROM *Candida rugosa* IMMOBILIZED USING MICROWAVE IRRADIATION

Mladen D. Mihailović, Zorica D. Knežević-Jugović, Dušan Ž. Mijin, Dejan I. Bezbradica

University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Lipases are very efficient biocatalysts with wide application in synthesis of important ingredients of food, cosmetics and pharmaceutical products, due to their capacity to catalyze both, ester synthesis and ester hydrolysis. The preparation of stable and active immobilized derivatives of lipases is necessity for their application in industrial enzymatic processes. In this work, the optimization of lipase from *C. rugosa* immobilization by microwave irradiation was performed, since it was previously reported that immobilization process can be drastically accelerated by means of microwave irradiation, even resulting with slight increase of lipase activity. Eupergit®, commercial support with active epoxy groups, was used as immobilization support. In first stage of our study, the immobilization time and ionic strength of immobilization buffer were optimized. It was found out that the highest immobilized activity can be achieved at high ionic strengths (1 M buffer) after 3 min, while further increase of immobilization time led to decrease of lipase activity. Then, the immobilized derivative obtained at optimum conditions was applied in synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent. Key reaction factors (temperature, water concentration, immobilized lipase concentration, and substrate molar ratio) were optimized using response surface methodology. The substrate conversion higher above 85% was achieved in our study. The statistical analysis revealed that each of analyzed factors had significant effect on yield of ester, with initial enzyme concentration and substrate molar ratio being the most prominent factors. The second-order regression model that describes the effect of all four factors on substrate conversion was established. The optimum values of factors were: temperature 50 °C, initial immobilized enzyme concentration 220 mg ml⁻¹, added water concentration 0.1% (v/v), and molar ratio acid/alcohol 2.5.

Keywords: Microwave • Eupergit® • Immobilization • Lipase