

Oleino rūgšties esterinimas 2-etilheksanolio taikant biotechnologinius metodus biotepalų gamybos technologijose

Ieva Čepaitė¹,

Milda Gumbytė²

¹ Kauno technologijos universitetas,
K. Donelaičio g. 73,
LT-44249 Kaunas
El. paštas ievcep@gmail.com

² Aleksandro Stulginskio universitetas,
Studentų g. 11,
LT-53361 Akademija, Kauno r.

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universitete, biologinių atliekų ir šalutinių produktų panaudojimo laboratorijoje. Darbo tikslas – įvertinti gamybos pramonės įmonių atliekinių medžiagų savybes ir pakartotinio panaudojimo galimybes. Šiame tyrime buvo nagrinėjamos 2-etilheksanoleato sintezės iš 2-etilheksanolio ir oleino rūgšties galimybės panaudojant pramoninius fermentus.

Siekiant parinkti efektyviausią biologinį katalizatorių nagrinėjamai sintezei, buvo vykdoma pramoninių lipazių atranka. Reakcijų metu matuotas rūgštingumas ir atlikta plonasluoksnė chromatografinė analizė.

Parinkus tinkamą lipazę (Lipozyme TL IM), sudarytas eksperimentinio plano modelis. Jį įvykdžius, nustatytos optimalios sąlygos nagrinėjamai reakcijai. Proceso temperatūra – 41,04 °C; proceso trukmė – 26,10 val.; 2-etilheksanolio ir oleino rūgšties molinis santykis – atitinkamai 2,35:1,16 mol/mol; fermento (Lipozyme TL IM) kiekis – 9,91 %.

Raktažodžiai: biosintezė, lipazė, 2-etilheksanoleatas

ĮVADAS

Pasaulinė tepalų rinka kiekvienais metais siekia apie 40 mln. tonų, iš kurių augalinių aliejų pagrindu pagaminti tepalai ir modifikuoti esteriai šiuo metu sudaro tik apie 10–15 % (*Grand View Research*, 2016). Pusė šių tepalų įvairiais būdais patenka į aplinką, užteršdami vandenį ir dirvožemį. Užterštumo galima išvengti apsisaugant nuo tokių patekimų, naudojant tepalus daugiau nei kartą arba naudojant biologiškai skaidžias tepamąsias medžiagas (Jain, Suhane, 2013). Ieškoma būdų, kaip mineralinę alyvą pakeisti aplinkai nežalinga tepamąja medžiaga (Bekal, Bhat, 2012).

Vadinamieji „aplinkai draugiški“ produktai nekelti pavojaus žmogaus sveikatai ir saugumui, neteršia vandens, dirvos bei oro (Salimon et al.,

2010). Be to, tokie produktai aplinkoje suyra savaime ar veikiant mikroorganizmams. Kadangi tepalai veikia aplinką visose gamybos, naudojimo ir utilizavimo stadijose, jie turi būti netoksiški kontakto ar įkvėpimo atveju.

Atsižvelgiant į šias ypatybes ir dėl visuomenės susirūpinimo, dauguma Europos šalių nustatė reikalavimus, skatinančius naudoti aplinkai nekenksmingus tepalus. Ši situacija sudarė unikalią galimybę sukurti naujus aplinkai tausojančius tepalus, pagamintus iš natūralių produktų. Tikslinga ieškoti tinkamų ir pigių biologinės kilmės žaliavų ir tepamųjų medžiagų gamybai (Bart et al., 2013).

Siekama rasti įvairių šaltinių biologinei alyvai gaminti (Gumbytė ir kt., 2013). Oleino rūgštis – alternativi žaliava šiam procesui. Didelė dalis šios

rūgštis susidaro įvairių pramonės procesų metu. Dažniausiai tai – maisto pramonės atlieka. Oleino rūgštis sudaro nemažą šių atliekų dalį, tad tikslinga ją tinkamai panaudoti. Atsižvelgiant į tai, kad oleino rūgštis – ilgagrاندė riebalų rūgštis, ji puikiai tinka bioalyvos sintezei. Oleino rūgštis pagrindu sintetinės biologinės alyvos pasižymi pagerintomis fizikocheminėmis ir tribologinėmis savybėmis (Salih et al., 2011).

2-etilheksanolis – plačiai pramonėje naudojamas alkoholis. Mažais kiekiais jo randama įvairiuose vaisiuose: abrikosuose, slyvose, obuoliuose (Matthaus, Ozcan, 2015). Iš jo gaminami plastikatoriai, dangos, klizai, įvairios kitos lipniosios medžiagos. Pramonės nutekamuosiuose vandenyse, atliekose galima aptikti šio junginio. Norint sumažinti aplinkos taršą, siekiama panaudoti kuo daugiau atliekų kuriant naujus produktus.

Siekiant rasti efektyviausią ir ekonomiškiausią biologinės alyvos sintezės būdą, bandoma naudoti biologinius katalizatorius (Razack, Durairasan, 2016). Kadangi tepalai yra esteriai, paprastai jiems sintetinti naudojamos lipazės (Chen et al., 2011).

TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Siekiant išsiaiškinti, kuris katalizatorius efektyviausiai vykdo norimą esterinimo reakciją (1 pav.), buvo įvertintas visų pramoninių lipazių katalizinis aktyvumas:

Lipozyme RM IM (lipazė iš *Rhizomucor miehei*, imobilizuota ant makroporingo plastiko, aktyvumas >30 U/g);

Lipozyme 435 (lipazė iš *Candida antarctica*, imobilizuota ant polipropileno, aktyvumas – 600 U/g);

Novozym 435 (lipazė iš *Candida antarctica*, imobilizuota ant polipropileno, aktyvumas $\geq 5\ 000$ U/g);

Lipozyme TL IM (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, imobilizuota ant silikagelio, aktyvumas $\geq 3\ 000$ U/g);

Lipoplase 100L (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, skysta, aktyvumas 122 kU/g);

Lecitase ultra (lipazė iš *Fusarium oxysporum*, skysta, aktyvumas 150 U/g);

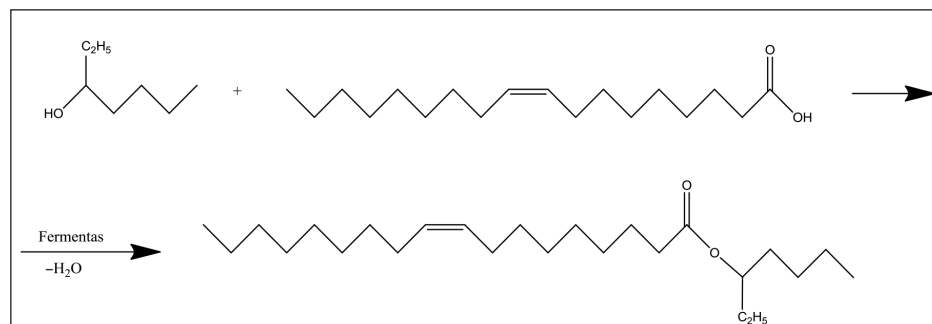
Resinase A 2X (lipazė iš *Aspergillus oryzae*, skysta, aktyvumas 119,6 kU/g).

Reakcijos vykdytos 24 valandas esant 40 °C temperatūrai, pasirinktas substratų (oleino rūgštis bei 2-etilheksanolio) molinis santykis 1:1. Naudotas fermento kiekis – 7 % nuo oleino rūgštis masės.

Esterinimo reakcija vykdyta konusinėje kolboje, kuri buvo sujungta su termometru ir temperatūros valdikliu bei maišykle (pastovus sukčių dažnis 250 min.⁻¹). Į kolbą buvo supilami substratai, pašildomi iki reikiamos (30–60 °C) temperatūros, tada įberiamas ar įpilamas biologinis katalizatorius. Įvykus reakcijai, t. y. praėjus numatytam laikui, lipazės nufiltruojamos (jei fermentas imobilizuotas) arba mišinys 10 min. pakaitinamas (esant skystam fermentui) 80 °C temperatūroje, denatūruotas fermentas taip pat pašalinamas filtruojant.

Vykdyt reakcijas, imti mėginiai: kas valandą plonasluoksnei chromatografiniai analizei; kas dvi valandas rūgštingumo tyrimams. Mėginiai imti kas valandą pirmas aštuonias reakcijos vyksmo valandas, o paskutinis mėginys paimtas praėjus 24 valandoms nuo reakcijos pradžios.

Pagal rūgštingumo sumažėjimą reakcijos terpėje buvo sprendžiamas sureagavusių rūgščių kiekis. Rūgštingumo tyrimai buvo atliekami pagal standarto LST EN ISO 660 „Gyvuliniai ir augaliniai riebalai ir aliejus. Rūgščių skaičiaus ir rūgštingumo nustatymas“ reikalavimus.



1 pav. 2-etilheksanololeato sintezės schema

Fig. 1. Scheme of 2-ethylhexanoate synthesis

Plonasluoksnei chromatografijai naudotos boru impregnuotos silikagelio G-25 plokštelės, kurių storis 0,25 mm. 50 µl produkto ištirpinama 500 µl dietileterio, gautas mišinys homogenizuojamas. 2 µl gauto mišinio švirksčiu užlašinama ant plonasluoksnės chromatografijos plokštelių. Kontrolei naudota oleino rūgštis (K_{OR}), reakcijoms – substratų mišinys santykiu 1:1 (K_0). Kontroliniai bandiniai taip pat ištirpinti dietileteryje. Plokštelės buvo įmerkiamos į eliuentą (petroleterio (PE) : dietileterio (DEE) : acto rūgšties (AR) mišinys atitinkamai santykiu 80:20:1) ir laikomos tol, kol nešiklis pasiekia apie 1–1,5 cm iki plokštelių viršaus. Eliuento buvo tiek, kad jis nepasemtų vietų, ant kurių buvo užlašinti mėginiai. Eliuentui kylant plokštele, tiriamosios medžiagos kyla kartu su nešikliu (eliuentu). Plokštelės išimamos bei džiovinamos ir laikomos jodo garų kameroje. Atsižvelgiant į tai, kad jodo garai sudaro spalvotus kompleksinius junginius su daugeliu organinių junginių, pakeltų mėginių vaizdas ant plokštelės išryškėja. Tada tirtų mėginių dėmės buvo lyginamos su kontrolinėmis dėmėmis, dėmesys kreipiamas į dėmių padėtį, užimamą plotą ir ryškumą.

Siekiant nustatyti optimalias oleino rūgšties esterinimo 2-etilheksanolio sąlygas, naudotasi Design-Expert 10 (Stat-Ease, Minneapolis) kompiuterine programa. Paviršiaus atsako metodologija (*response surface methodology* (RSM)) yra patikimas cheminių tyrimų statistinis paketas, kuriuo galima apdoroti cheminius / biocheminius procesus, optimizuojant parametrus su mažiausiu eksperimentų skaičiumi. Parinkus procesui adekvačiai atitinkantį

modelį ir radus jį aprašančią lygtį, galima rasti kintamųjų vertes, kurios lemtų norimą atsako reikšmę.

Nagrinėjama penkių veiksnių (*Numeric factors*) sistema (1 lentelė). Sumodeliuotas penkių veiksnių eksperimentinis planas pagal centrinę kompozicinę (*Central composite*) modelį, kurį sudaro 50 bandymų. Procese buvo naudojamas rūgštingumo atsakas. Atlikus eksperimento plane numatytus eksperimentus (kiekvienas bandymas kartotas tris kartus), rezultatai buvo analizuojami, taikytas geriausiai rezultatus atitinkantis modelis. Eksperimentų rezultatai pateikiami grafikuose ir lentelėse. Atsižvelgiant į diagnostikos rezultatus sudarytas modelis. Jeigu aptinkamos eksperimento klaidos, jos buvo pašalinamos iš modelio, taip pat pašalinami nereikšmingi kintamieji, jei be jų modelis geriau aprašo eksperimentinius duomenis.

Duomenų analizė ir jų dispersinė analizė (ANOVA) parodė, kad atsakas geriausiai buvo aprašomas kvadratinio modeliu (*Quadratic Model*). Atsakui prognozuoti naudota kvadratinė polinominė funkcija:

$$\mu = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^4 \beta_{iii} X_i^3$$

μ – atsakas (priklausomas kintamasis); X_i ir X_j – nepriklausomi kintamieji; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , β_{iii} – pastovūs koeficientai (tiesinės, kvadratinės ir sąveikos dedamųjų).

1 lentelė. Nagrinėjamų veiksnių reikšmių diapazonas

Table 1. The range of relevant factor values

| Pavadinimas <i>Title</i> | Matavimo vienetai <i>Units of measurement</i> | Minimali reikšmė <i>Minimum value</i> | Maksimali reikšmė <i>Maximum value</i> | Vidutinė reikšmė <i>Average value</i> | Standartinis nuokrypis <i>Standard deviation</i> |
|---|--|--|---|--|---|
| Fermento masės dalis <i>Enzyme parts by weight</i> | % | 1 | 10 | 5,5 | 3,71 |
| Temperatūra <i>Temperature</i> | °C | 30 | 60 | 45,0 | 12,37 |
| Trukmė <i>Duration</i> | val. | 24 | 30 | 27,0 | 2,47 |
| Alkoholio kiekis <i>Quantity of alcohol</i> | mol | 1 | 3 | 2,0 | 0,82 |
| Rūgšties kiekis <i>Quantity of acid</i> | mol | 1 | 3 | 2,0 | 0,82 |

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Siekant parinkti efektyviausią biokatalizatorių 2-etilheksanololeato biotechnologinei sintezei, įvertintas visų minėtų pramoninių lipazių selektyvumas vykdomai reakcijai (1 pav.). Reakcijos produkto susidarymas vertinamas pagal oleino rūgšties kiekio sumažėjimą reakcijos terpėje. Mažėjantis rūgštingumas reakcijos terpėje reiškia, kad bandinyje rūgščių skaičius mažėja – jungiasi į esterius. Gauti duomenys pateikti 2 paveiksle.

Iš pateiktų duomenų matyti, kad mažiausiu kataliziniu aktyvumu pasižymėjo lipazės Lipoplase 100L, Lecitase Ultra ir Resinase A 2X. Naudojant šias lipazes, pasibaigus reakcijos vykdymo laikui, susidarė rūgštingumai atitinkamai 64,37, 60,59, 48,62 %.

Įvertinus visą procesą, nustatytas efektyviausias katalizatorius 2-etilheksanololeato biotechnologinei sintezei – Lipozyme TL IM. Atsižvelgiant į tai, kad pirmomis reakcijos vyksmo valandomis fermentas didelio aktyvumo neparodė (rūgštingumas po dviejų valandų – 65,24 %, po aštuonių – 56,29 %), tačiau po 24 val. mėginio rūgštingumas sumažėjo net iki minimumo – 6,65 %.

Biologinis katalizatorius Lipozyme TL IM ekonomiškai naudingiausias, kadangi jo kaina, palyginti su kitomis pramoninėmis lipazėmis, itin skiriasi (pvz., Novozym 435 kainuoja 1 200–1 600 EUR/kg, Lipozyme TL IM – 75–90 EUR/kg). Šis kriterijus leidžia rinktis ilgesnį katalizuo-

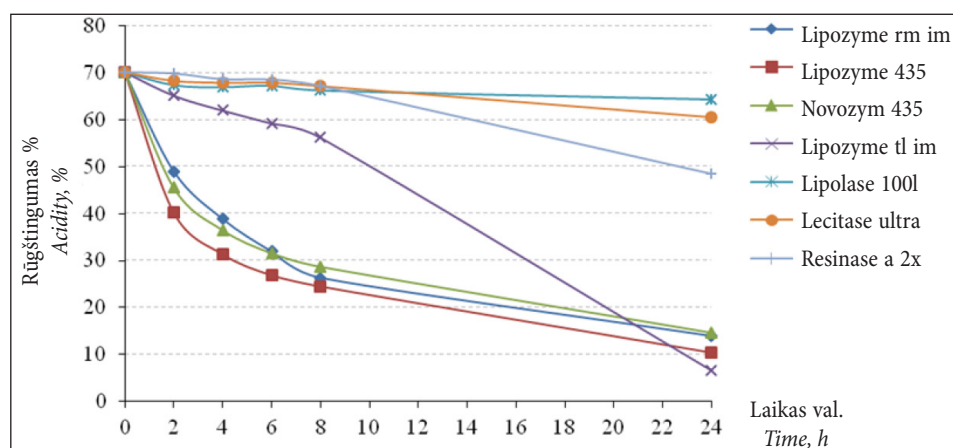
jamos reakcijos vyksmo laiką nepaisant energijos išteklių.

Siekiant ištirti reakcijos eigą, kas valandą iš reakcijos mišinio imti mėginiai plonasluoksnei chromatografijai. Mėginiai lyginti su gryna oleino rūgštimi ir 2-etilheksanolio bei oleino rūgšties mišiniu, atitinkančiu reakcijai imto mišinio koncentraciją (nulinis taškas). Rezultatai pateikti 3–4 paveiksluose.

Visos naudotos lipazės laikui bėgant formuoja tą patį produktą, kadangi nutraukus reakciją po 24 valandų ant plokštelės matomos dėmės tame pačiame aukštyje. Iš gautų rezultatų matyti, kad 1–3 numeriais pažymėtos lipazės jau praėjus 3–4 valandoms nuo reakcijos vyksmo pradžios pradėjo sintetinti reikiamą produktą, kitoms (4–7 numeriais pažymėtoms) lipazėms reikėjo daugiau laiko.

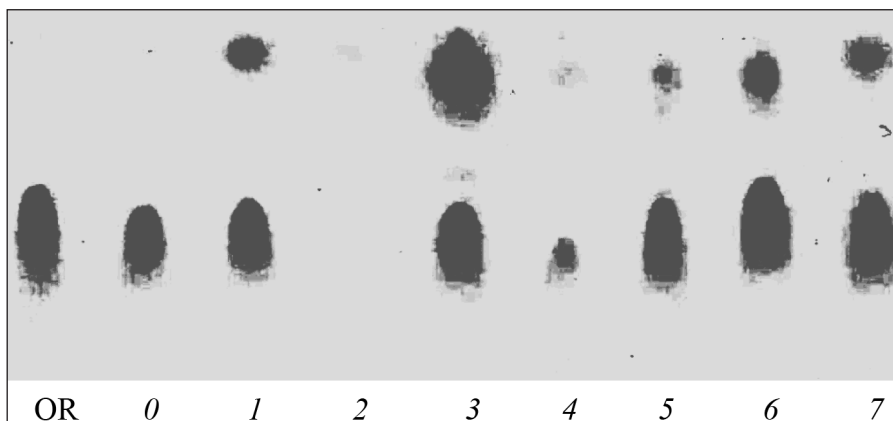
Pagal rūgštingumo tyrimo rezultatus, efektyviausia lipazė Lipozyme TL IM produktą pradėjo sintetinti praėjus 6–7 valandoms, tačiau labai neintensyviai. Po 24 valandų matyti, kad produkto kiekis yra gerokai padidėjęs. Plokštelėje, kurioje tirtas mėginys po 5 valandų nuo reakcijos vyksmo pradžios, matyti, jog šis fermentas greičiausiai pirma susintetina tarpinį junginį (matyti dėmė, kuri nesutampa su galutinio produkto palikta dėme), iš kurio vėliau sintetinamas galutinis produktas. Dėl šios priežasties reakcija turi būti vykdoma ilgiau nei su kitomis lipazėmis.

Atlikus eksperimento plane numatytus bandymus, rezultatai analizuojami, taikomas geriausiai



2 pav. Lipazių efektyvumas oleino rūgšties esterinio reakcijoje (temperatūra – 40 °C, molinis substratų santykis – 1:1, fermento koncentracija – 7 % nuo oleino rūgšties masės)

Fig. 2. Lipase efficiency in esterification reaction (temperature 40 °C, molar substrate ratio 1:1, enzyme concentration 7% of oleic acid quantity)

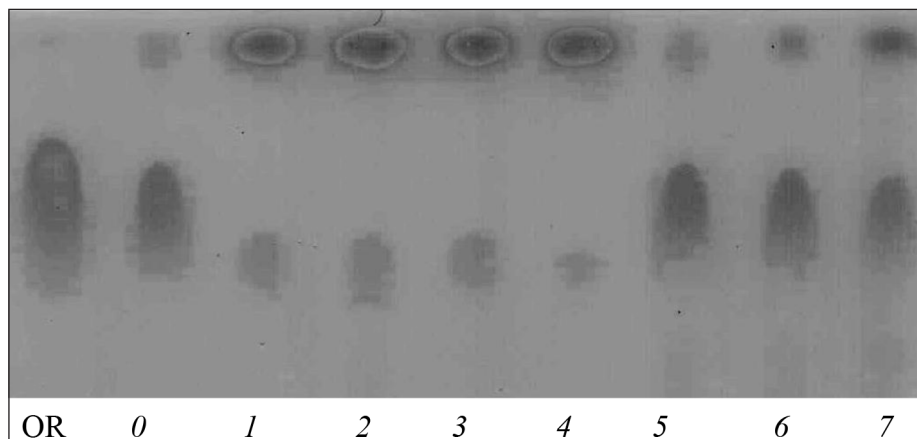


3 pav. Plonasluoksnės chromatografijos tyrimo rezultatai. Mėginiai imti praėjus 1 val. nuo reakcijos vyksmo pradžios (OR – oleino rūgštis; 0 – nulinis taškas; 1 – Lipozyme RM IM; 2 – Lipozyme 435; 3 – Novozym 435; 4 – Lipozyme TL IM; 5 – Lipoplase 100L; 6 – Lecitase Ultra; 7 – Resinase A 2X)

Fig. 3. The results of thin layer chromatography. Samples were taken one hour after the start of reaction (OR, oleic acid; 0, point zero; 1, Lipozyme RM IM; 2, Lipozyme 435; 3, Novozym 435; 4, Lipozyme TL IM; 5, Lipoplase 100L; 6, Lecitase Ultra; 7, Resinase A 2X)

rezultatus atitinkantis modelis. Šiame tiriamajame darbe sąryšis tarp atsako (rūgštingumo) ir penkių proceso kintamųjų (alkoholio ir oleino rūgšties molinio santykio, biokatalizatoriaus kiekio, proceso temperatūros ir trukmės) buvo įvertintas naudojant paviršiaus atsako metodologiją. Design-Expert 10 programinė įranga buvo naudojama siekiant nustatyti ir įvertinti visus regresijos modelio lygties koeficientus ir jų statisti-

nus reikšmingumus. Statistinė dispersinė analizė (ANOVA) naudota vertinant pritaikyto modelio tinkamumą gautoms eksperimentinėmis reikšmėms. Iš duomenų ir statistinės dispersinės analizės matyti, kad atsakas geriausiai buvo aprašomas kvadratinio modeliu *Quadratic Model*, t. y. antrojo laipsnio polinominiu modeliu. Pagal šį modelį sudaryta galutinė proceso lygtis, aprašanti eksperimentinius taškus:



4 pav. Plonasluoksnės chromatografijos tyrimo rezultatai. Mėginiai imti praėjus 24 val. nuo reakcijos vyksmo pradžios (OR – oleino rūgštis; 0 – nulinis taškas; 1 – Lipozyme RM IM; 2 – Lipozyme 435; 3 – Novozym 435; 4 – Lipozyme TL IM; 5 – Lipoplase 100L; 6 – Lecitase Ultra; 7 – Resinase A 2X)

Fig. 4. The results of thin layer chromatography. Samples were taken 24 hours after the start of reaction (OR, oleic acid; 0, point zero; 1, Lipozyme RM IM; 2, Lipozyme 435; 3, Novozym 435; 4, Lipozyme TL IM; 5, Lipoplase 100L; 6, Lecitase Ultra; 7, Resinase A 2X)

$$R_1 = 448,27050 - 1,54103 \cdot F - 2,60414 \cdot T - 26,23950 \cdot H + 10,82257 \cdot A + 30,23302 \cdot R - 9,25058 \cdot 10^{-4} \cdot F \cdot T - 0,057677 \cdot F \cdot H - 0,34530 \cdot F \cdot A + 0,89729 \cdot F \cdot R - 0,023366 \cdot T \cdot H + 0,033184 \cdot T \cdot A + 0,065460 \cdot T \cdot R - 0,67949 \cdot H \cdot A + 1,19064 \cdot H \cdot R - 8,64257 \cdot A \cdot R - 0,23673 \cdot F^2 + 0,033817 \cdot T^2 + 0,47360 \cdot H^2 + 3,30463 \cdot A^2 - 10,54279 \cdot R^2.$$

R_1 – rūgštingumas %;

F – fermento kiekis %;

T – proceso temperatūra °C;

H – proceso trukmė val.;

A – alkoholio kiekis mol.;

R – rūgšties kiekis mol.

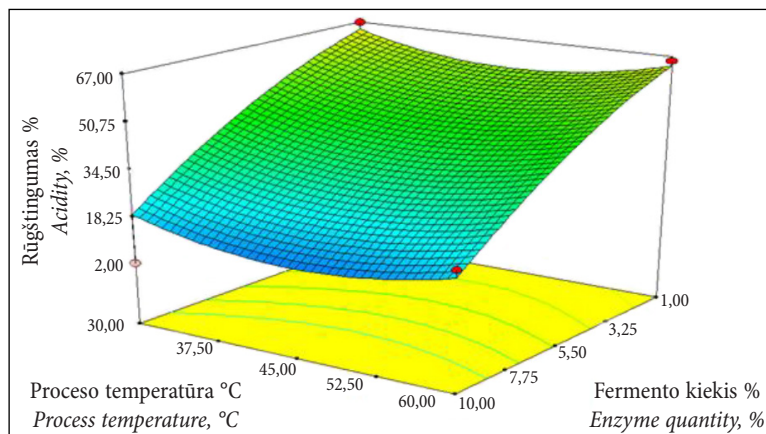
Statistinių duomenų modelių dispersijų santykio (F) vertė lygi 9,52. Tai reiškia, kad modelis yra statistiškai reikšmingas. Egzistuoja tik 0,01 % galimybė, kad tokia didelė modelio F-vertė atsirastų dėl triukšmų (paklaidų, natūralaus išsibarstymo). Vertinant modelio tinkamumą, analizuojamos liekanos ir skaičiuojamas determinacijos koeficientas (R^2). Determinacijos koeficientas parodo, kokią dalį tiriamojo požymio dispersijos apima naudojamas matematinis modelis. Determinacijos

koeficientas, koreguoti modelio parametrų skaičiui, atitinkančiam eksperimento plano taškus, yra 0,8687, t. y. modelis gali paaiškinti 86,87 % atsako svyravimų. Eksperimento planui prognozuota R^2 vertė lygi 0,6276 ir yra artima koreguotai R^2 vertei (jos neturėtų skirtis daugiau nei 0,2).

Atitinkamo tikslumo vertė nagrinėjamam modeliui yra 12,993. Ši vertė parodo signalo ir triukšmo santykį. Pageidautina, kad vertė būtų didesnė nei 4. Šio modelio atveju atitinkamo tikslumo vertė yra daugiau nei 3 kartus didesnė už pageidaujamą vertę.

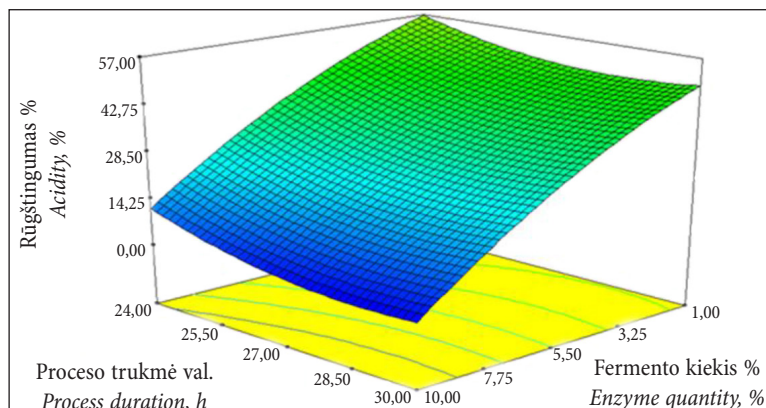
Siekiant išsiaiškinti ryšį tarp nepriklausomų kintamųjų ir atsako (rūgštingumo), buvo nagrinėjami proceso atsako paviršiaus trimačiai modeliai (5–14 pav.). Kiekvienu atveju buvo fiksuojami du nepriklausomi kintamieji (X ir Y ašyse), priklausomų kintamųjų reikšmės parenkamos tokios, kad atsako paviršius nusakytų mažiausią įmanomą atsako vertę.

Išanalizavus grafikuose pateiktas reakcijos veiksmų priklausomybes, galima daryti išvadą, kad norint pasiekti mažiausią proceso rūgštingumą procesą reikia vykdyti tokiomis sąlygomis:



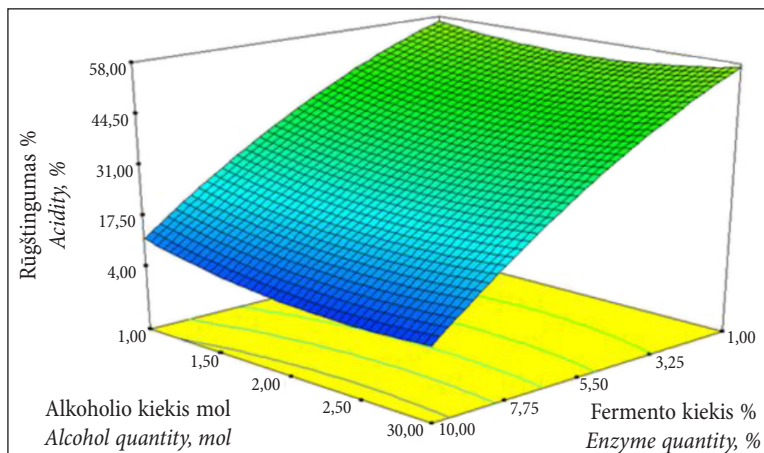
5 pav. Proceso temperatūros ir fermento kiekio sąveikos atsako paviršius, kai proceso trukmė – 24 val.; rūgšties ir alkoholio molinis santykis – 1:1 mol/mol

Fig. 5. Response surface of the interaction between the process temperature and enzyme amount when duration is 24 h and acid and alcohol molar ratio 1:1, mol/mol



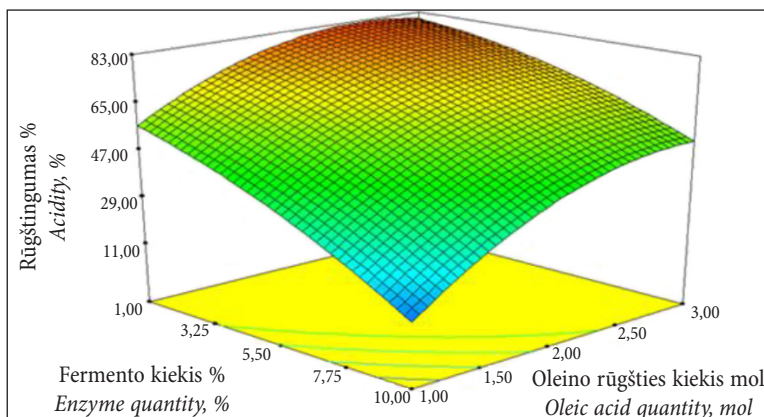
6 pav. Proceso trukmės ir fermento kiekio sąveikos atsako paviršius, kai proceso temperatūra – 45 °C; rūgšties ir alkoholio molinis santykis – 1:1 mol/mol

Fig. 6. Response surface of the interaction between the process duration and enzyme amount when temperature is 45 °C and acid and alcohol molar ratio 1:1, mol/mol



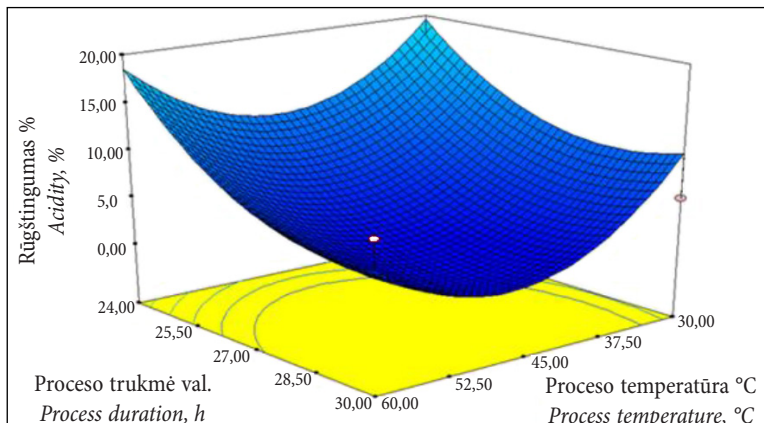
7 pav. Alkoholio ir fermento kiekio sąveikos atsako paviršius, kai proceso temperatūra – 45 °C; proceso trukmė – 24 val.; oleino rūgšties kiekis – 1 mol

Fig. 7. Response surface of the interaction between the alcohol and enzyme amount when temperature is 45 °C, duration 24 h and quantity of oleic acid 1 mol



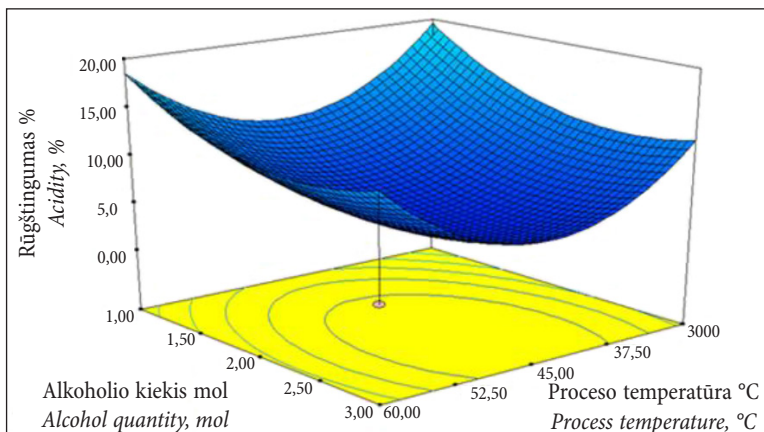
8 pav. Fermento ir oleino rūgšties kiekio sąveikos atsako paviršius, kai proceso temperatūra – 45 °C; proceso trukmė – 24 val.; alkoholio kiekis – 1 mol

Fig. 8. Response surface of the interaction between the enzyme and oleic acid amount when temperature is 45 °C, duration 24 h and quantity of alcohol 1 mol



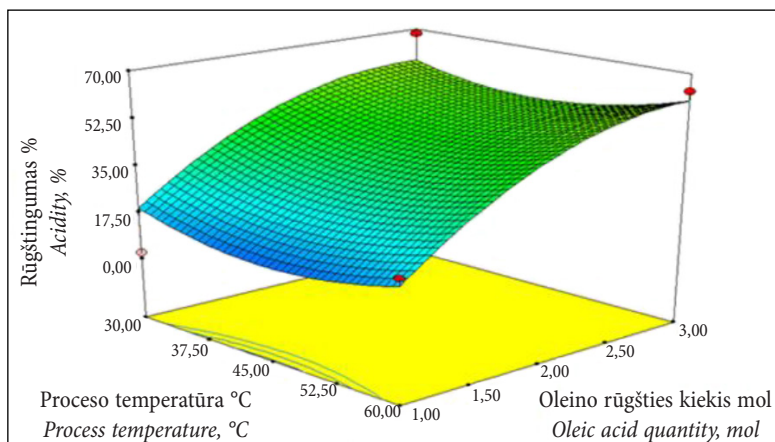
9 pav. Proceso trukmės ir temperatūros sąveikos atsako paviršius, kai rūgšties ir alkoholio molinis santykis – 1:1 mol/mol; fermento kiekis – 10 %

Fig. 9. Response surface of the interaction between the process duration and temperature when acid and alcohol molar ratio is 1:1, mol/mol, and enzyme quantity is 10%



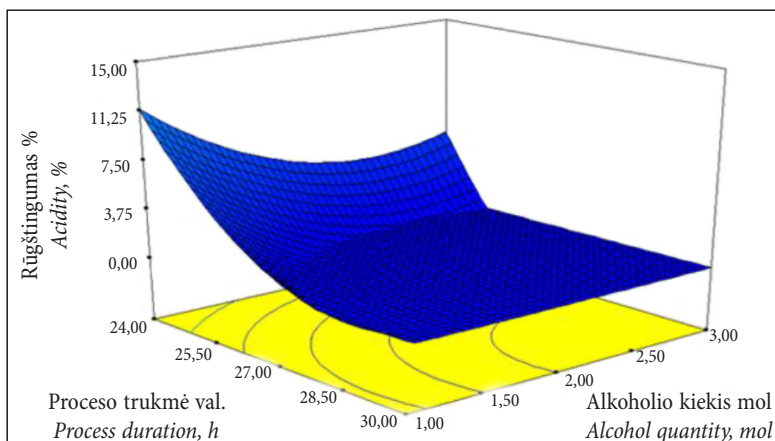
10 pav. Proceso trukmės ir temperatūros sąveikos atsako paviršius, kai rūgšties kiekis – 1 mol; fermento kiekis – 10 %; proceso trukmė – 24 val.

Fig. 10. Response surface of the interaction between the process duration and temperature when acid quantity is 1 mol, enzyme quantity 10% and duration 24 h



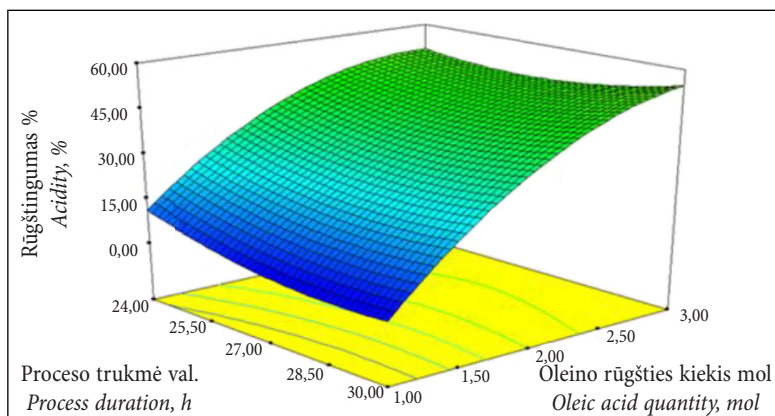
11 pav. Proceso temperatūros ir oleino rūgštis kiekio sąveikos atsako paviršius, kai alkoholio kiekis – 1 mol; fermento kiekis – 10 %; proceso trukmė – 24 val.

Fig. 11. Response surface of the interaction between the process temperature and oleic acid amount when alcohol quantity is 1 mol, enzyme quantity 10% and duration 24 h



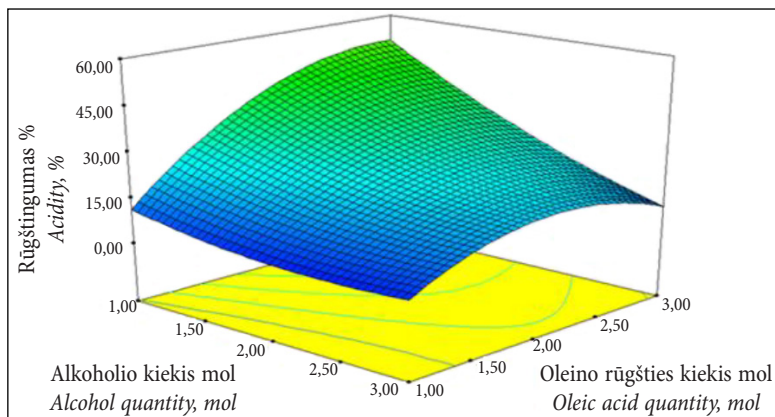
12 pav. Proceso trukmės ir alkoholio kiekio sąveikos atsako paviršius, kai rūgštis kiekis – 1 mol; fermento kiekis – 10 %; proceso temperatūra – 45 °C

Fig. 12. Response surface of the interaction between the process duration and alcohol amount when oleic acid quantity is 1 mol, enzyme quantity 10% and temperature 45 °C



13 pav. Proceso trukmės ir oleino rūgštis kiekio sąveikos atsako paviršius, kai alkoholio kiekis – 1 mol; fermento kiekis – 10 %; proceso temperatūra – 45 °C

Fig. 13. Response surface of the interaction between the process duration and acid amount when alcohol quantity is 1 mol, enzyme quantity 10% and temperature 45 °C



14 pav. Alkoholio ir oleino rūgštis kiekio sąveikos atsako paviršius, kai fermento kiekis – 10 %; proceso temperatūra – 45 °C; proceso trukmė – 24 val.

Fig. 14. Response surface of the interaction between the alcohol and acid amount when enzyme quantity is 10 %, temperature 45 °C and duration 24 h

- proceso trukmė – 24 val;
- proceso temperatūra – 45 °C;
- molinis substratų (rūgšties ir alkoholio) santykis – 1:1 mol/mol;
- fermento kiekis – 7 % nuo oleino rūgšties masės.

Siekiant rasti sąlygas, kurioms esant būtų galima gauti mažiausią tiriamo proceso atsaką (rūgštingumą), atliktas reakcijos sąlygų optimizavimas, t. y. nustatytos nepriklausomų kintamųjų vertės, prie kurių būtų pasiekti apibrėžti tikslai. Optimizuojant buvo siekiama patenkinti šiuos kriterijus:

- minimizuoti fermento kiekį (vidutinė santykinė svarba, indeksas 3);
- minimizuoti temperatūrą (vidutinė santykinė svarba, indeksas 3);
- minimizuoti oleino rūgšties kiekį (vidutinė santykinė svarba, indeksas 3);
- minimizuoti 2-etil-1-heksanolio kiekį (vidutinė santykinė svarba, indeksas 3);
- minimizuoti atsaką (rūgštingumą (vidutinė santykinė svarba, indeksas 5).

Optimizavimas buvo atliekamas pagal standartinės apibrėžiamas vertes: vykdoma 50 ciklų, filtruojami sutampantys sprendiniai (filtro $\epsilon = 0$), simplekso dalis 10 %, maksimalus sprendinių skaičius – 30. Pirmieji du sprendiniai pateikiami 2 lentelėje.

Išanalizavus proceso optimizavimo sprendinius, atlikti trys eksperimentai pagal pirmojo sprendinio plane nurodytas sąlygas. Gautas esterinio proceso rūgštingumas $1,5 \pm 0,08$ %. Daroma išvada, kad realaus eksperimento rezultatai nereikšmingai skiriasi nuo optimizavimo modelio, tad jis tinkamai aprašo procesą.

Atsižvelgiant į tai, kad darbo metu buvo naudotos grynos medžiagos, tolimesniuose tyrimuose siūloma iširti 2-etilheksanololeato biosintezės technologijas taikant atliekines žaliavas (chemijos, maisto ir kitų pramonės šakų). Siekiant sumažinti

ekonominius kaštus, siūloma tirti lipazės aktyvumą, panaudojus šį fermentą nagrinėjamai biosintezėi. Sumažėjus biokatalizatoriaus aktyvumui, rekomenduojama nagrinėti fermento regeneravimo galimybes ir pakartotinį šios medžiagos panaudojimą.

IŠVADOS

1. Įvertinus pramoninių lipazių atrankumą 2-etilheksanololeato sintezės substratams, parinktas efektyviausias nagrinėjamam procesui ir ekonomiškai naudingiausias fermentas – Lipozyme TL IM.

2. Sudarius eksperimentinį planą ir įvykdžius reakcijas jame nurodytomis sąlygomis, įvertintas nagrinėjamų veiksnių poveikis 2-etilheksanololeato biosintezėi. Nustatyta procesą aprašanti kvadratinė polinominė lygtis. Procesas optimizuotas, nustatytos optimalios reakcijos vykdymo sąlygos:

- a) proceso temperatūra – 41,04 °C;
- b) proceso trukmė – 26,10 val.;
- c) 2-etilheksanolio ir oleino rūgšties molinis santykis – atitinkamai 2,35:1,16 mol/mol;
- d) fermento kiekis – 9,91 %.

Gauta 2016 11 22
Priimta 2017 03 20

LITERATŪRA

1. Bart J., Gucciardi E., Cavallaro S. 2013. *Biolubricant Product Development*. Cambridge: Woodhead Publishing. 920 p.
2. Bekal S., Bhat N. R. 2013. Bio-lubricant as an alternative to mineral oil for a CI engine – an experimental investigation with pongamia oil as a lubricant. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. Vol. 34(11). P. 1016–1026 [žiūrėta 2016-09-26]. Prieiga per internetą: <http://dx.doi.org/10.1080/15567031003735303>

2 lentelė. Rūgšties esterinio alkoholiu proceso optimizavimo sprendiniai

Table 2. Solutions of esterification reaction process

| Nr. No. | Fermento kiekis % Enzyme quantity, % | Temperatūra °C Temperature, °C | Trukmė val. Duration, h | Alkoholio ir rūgšties molinis santykis mol/mol Alcohol and acid molar ratio, mol/mol | Rūgštingumas % Acidity, % | Pageidaujamumas Desirability |
|---------|---|-----------------------------------|----------------------------|---|------------------------------|---------------------------------|
| 1. | 9,91 | 41,04 | 26,10 | 2,35:1,16 | 1,35 | 1,00 |
| 2. | 9,95 | 31,98 | 28,77 | 1,71:1,02 | 1,35 | 1,00 |

3. Chen H., Ju H., Wu T., Liu Y., Lee C., Chang C., Chung Y., Shies C. 2011. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: optimization and enzyme reuse study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 2011 [žiūrėta 2016-10-15]. Prieiga per internetą: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/950725/>
4. *Grand View Research* [žiūrėta 2016-04-13]. Prieiga per internetą: <http://www.grandview-research.com/industry-analysis/lubricants-market/segmentation>
5. Gumbytė M., Makarevičienė V., Kalenskaya V., Junik A. 2013. Aliejingųjų augalų aliejaus panaudojimo galimybės biodyzelino gamybai. *Žemės ūkio mokslai*. T. 20. Nr. 1–20. P. 1–9.
6. Jain A. K., Suhane A. 2013. Biotechnology: A way to control environmental pollution by alternative lubricants. *Research in Biotechnology*. Vol. 4. No. 3. P. 38–42 [žiūrėta 2016-09-26]. Prieiga per internetą: <http://researchinbiotechnology.com/index.php/rib/article/view/130/116>
7. Matthaus B., Ozcan M. 2015. Oil content, fatty acid composition and distributions of vitamin-E-active compounds of some fruit seed oils. *Antioxidants*. Vol. 4. P. 124–133 [žiūrėta 2016-10-15]. Prieiga per internetą: www.mdpi.com/journal/ntioxidants
8. Razack S. A., Duraiarasan S. 2016. Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme. *Waste Management*. Vol. 47. P. 98–104.
9. Salih N., Salimon J., Yousif E. 2011. The physicochemical and tribological properties of oleic acid based triester biolubricants. *Industrial Crops and Products*. Vol. 34(1). P. 1089–1096.
10. Salimon J., Salih N., Yousif E. 2010. Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 112(5). P. 519–530.
11. Salimon J., Salih N., Yousif E. 2011. Chemically modified biolubricant basestocks from epoxidized oleic acid: Improved low temperature properties and oxidative stability. *Journal of Saudi Chemical Society*. Vol. 15(3). P. 195–201.

Ieva Čepaitė, Milda Gumbytė

BIOTECHNOLOGICAL ESTERIFICATION OF OLEIC ACID WITH 2-ETHYLHEXANOL IN BIOLUBRICANT SYNTHESIS TECHNOLOGIES

Summary

The possibilities of waste materials re-use in biosynthesis of grease were investigated. In this paper, 2-ethylhexanololeate synthesis from 2-ethylhexanol and oleic acid using industrial enzymes is discussed.

In order to select an effective enzyme for the mentioned synthesis, the selection of industrial lipases was carried out. During the reactions, acidity of the substances was measured and a chromatographic analysis was held to observe the reaction rate.

After choosing the suitable lipase (Lipozyme TL IM), an experimental model was created. When all reactions from the plan were completed, optimal conditions were estimated. The process temperature was 41.04 °C, the duration of the process was 26.10 h, the molar ratio of 2-ethylhexanololeate and oleic acid was 2.35:1.16 mol/mol, and the enzyme quantity (according to acid quantity) was 9.91%.

Keywords: biosynthesis, lipase, 2-ethylhexanololeate