

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití enzymatické katalýzy pro přípravu epoxidů

Kristýna Dvořáková

Bakalářská práce

Pardubice

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna Dvořáková**
Osobní číslo: **C19174**
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Využití enzymatické katalýzy pro přípravu epoxidů**
Téma práce anglicky: **The Use Of Enzymatic Catalysis For The Preparation Of Epoxides**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Popište enzymatické katalyzátory (zdroje enzymů, klasifikace a použití) včetně imobilizace.
2. Zaměřte se zejména na použití v transesterifikaci a epoxidace olejů nebo esterů.
3. Porovnejte katalyzátory a vyberte vhodný na katalýzu epoxidace.
4. Proveďte stanovení aktivity vybraného enzymu, jeho imobilizaci a katalýzu.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

recentní vědecká literatura, publikace z databáze WOS, PubMed, Sciencedirect apod. Dále dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Martin Hájek, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Konzultant bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlášení autora

Práci s názvem *Využití enzymatické katalýzy pro přípravu epoxidů* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 06. 2023

Kristýna Dvořáková

Poděkování

Ráda bych využila této příležitosti k vyjádření poděkování vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Martinu Hájkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Lucii Korecké Ph.D., bez které by práce s enzymy nebyla možná. Děkuji za jejich podporu, trpělivost, cenné rady, věcné připomínky, inspiraci během celé práce a za jejich čas, který mi v průběhu věnovali. Tato cesta byla plná výzev a překonávání překážek, přestože byla mnohdy náročná, byla také neuvěřitelně obohacující. Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině za nepřetržitou podporu a trpělivost během celého studia.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá enzymatickou katalýzou pro přípravu epoxidů rostlinných olejů s využitím enzymu *Candida rugosa*, imobilizovaného na jamkách mikrotitrační destičky. Enzymatická katalýza představuje slibnou alternativu chemické katalýzy a výroby epoxidů z ropných produktů. Teoretická část popisuje enzymy jako katalyzátory chemických reakcí, jejich strukturu, způsob imobilizace a stejně tak i vlastnosti, strukturu a využití olejů a tuků. Hlavní důraz je kladen na aplikaci enzymů v oleochemii a srovnání dosavadních publikací zaměřených na enzymatickou epoxidaci olejů. Součástí práce je vyhodnocení hydrolytické aktivity solubilní a imobilizované lipázy a vliv reakčních podmínek a prostředí. Průběh epoxidace byl stanovován pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací, kde byly sledovány jednotlivé funkční skupiny. Z výsledků analýzy vyplývá, že imobilizovaná lipáza *Candida rugosa* není za testovaných podmínek vhodným katalyzátorem epoxidace rostlinných olejů.

Klíčová slova

enzymy, enzymatická katalýza, mastné kyseliny, epoxidace, lipázy, imobilizace

The Use of Enzymatic Catalysis for the Preparation of Epoxides

Annotation

This bachelor's thesis focuses on enzymatic catalysis for the preparation of epoxides from plant oils using *Candida rugosa* enzyme immobilized on microtiter plate wells. Enzymatic catalysis offers a promising alternative to chemical catalysis and the production of epoxides from petroleum-based products. The theoretical part describes enzymes as catalysts in chemical reactions, including their structure, immobilization methods, as well as the properties, structure, and utilization of oils and fats. Emphasis is placed on the application of enzymes in oleochemistry, and a comparison of existing publications focused on enzymatic epoxidation of oils. This thesis evaluates the hydrolytic activity of soluble and immobilized lipase and the influence of reaction conditions and environment. The progress of epoxidation was determined using Fourier-transform infrared spectroscopy, monitoring the individual functional groups. The analysis results indicate that the immobilized lipase *Candida rugosa* is not a suitable catalyst for the epoxidation of plant oils under the tested conditions.

Keywords

enzymes, enzymatic catalysis, fatty acids, epoxidation, immobilization, lipase

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Úvod | 11 |
| 1 Teoretická část | 12 |
| 1.1 Enzymy | 12 |
| 1.1.1 Struktura a charakteristika enzymů | 12 |
| 1.1.2 Interakce enzym-substrát | 13 |
| 1.1.3 Specifita enzymů | 15 |
| 1.1.4 Mechanismus a kinetika enzymatické katalýzy | 15 |
| 1.1.5 Nomenklatura a klasifikace enzymů | 17 |
| 1.1.6 Zdroje enzymů | 18 |
| 1.1.7 Imobilizace enzymů | 19 |
| 1.1.8 Využití enzymů | 20 |
| 1.2 Oleje a tuky | 21 |
| 1.2.1 Využitý olejů a tuků | 22 |
| 1.2.2 Enzymatická transesterifikace rostlinných olejů | 23 |
| 1.2.3 Enzymatická epoxidace rostlinných olejů | 24 |
| 2 Experimentální část | 28 |
| 2.1 Chemikálie a materiály | 28 |
| 2.2 Imobilizace lipázy <i>Candida rugosa</i> | 29 |
| 2.2.1 Imobilizace lipázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu | 29 |
| 2.2.2 Imobilizace lipázy na jamky mikrotitrační destičky | 30 |
| 2.3 Měření hydrolytické aktivity lipázy | 30 |
| 2.3.1 Aktivita imobilizované lipázy | 30 |
| 2.4 Enzymatická epoxidace | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5 | Analýza výsledků epoxidace metodou FT-IR | 31 |
| 3 | Výsledky a diskuse | 32 |
| 3.1 | Měření hydrolytické aktivity solubilní lipázy | 32 |
| 3.1.1 | Závislost aktivity lipázy na teplotě | 34 |
| 3.1.2 | Závislost hydrolytické aktivity lipázy na pH | 35 |
| 3.2 | Výsledek enzymatické epoxidace | 36 |
| 4 | Závěr | 38 |

Seznam ilustrací a tabulek

Ilustrace

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Strukturní komponenty molekuly enzymu | 13 |
| 2 | Interakce enzym-substrát: Fischerův a Koshlandův model | 14 |
| 3 | Diagram přechodného stavu | 16 |
| 4 | Enzymatická samo-epoxidace methyloleátu | 25 |
| 5 | Závislost absorpance na čase pro stanovení aktivity solubilní lipázy | 33 |
| 6 | Kalibrační křivka solubilní lipázy <i>C. rugosa</i> | 34 |
| 7 | Teplotní optimum hydrolytické aktivity solubilní lipázy | 35 |
| 8 | Závislost hydrolytické aktivity lipázy na pH | 36 |
| 9 | Záznam infračervené spektrometrie | 37 |

Tabulky

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Význam hodnoty změny volné energie (ΔG) | 16 |
| 2 | Příklady nenasycených mastných kyselin | 22 |
| 3 | Přehled reakčních podmínek epoxidace vybraných studií | 27 |

Seznam zkratek a značek

| | |
|---------------|--|
| ATP | Adenosintrifosfát |
| ATR | Zeslabená úplná reflektance |
| C=C | Dvojná vazba mezi dvěma uhlíky |
| C | Uhlík |
| CLEA | Agregáty zesíťovaných enzymů |
| ‡ | Přechodný stav |
| E | Enzym |
| EC | Enzyme Commission |
| EP | Komplex enzym–produkt |
| ES | Komplex enzym–substrát |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FT–IR | Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací |
| G | Gibbsova energie, J/mol |
| HEPES | N–2–hydroxyethylpiperazin–N'–2–ethansulfonová kyselina |
| IČ | Infračervený |
| ME | Methylester |
| MEŘO | Methylester řepkového oleje |
| MK | Mastná kyselina |
| MOFs | Organokovové kostry (metal–organic frameworks) |
| MP | Molární poměr |
| NAD(P) | Nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) |
| NPB | 4– <i>p</i> –nitrofenylbutyrát |
| P | Produkt |
| PBS | Fosfátový roztok s 0,15M chloridem sodným |
| PSCI | Amano lipáza PS imobilizovaná na keramice |
| RT | Laboratorní teplota |
| S | Substrát |
| SMSO | Ostropestřecový olej (<i>Silybum marianum L.</i> seeds oil) |
| TOFA | Talový olej |
| UV | Ultrafialové záření |

Úvod

Rostlinné oleje jsou součástí každodenního života, především jako alternativa živočišných tuků v potravinářství. Využívají se rovněž v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. V současnosti nabývá na potenciálu jejich využití jako alternativa produktů získávaných z fosilních zdrojů, jejichž zásoby jsou omezené, představují tak šetrnější proces k životnímu prostředí.

Velkou nevýhodou rostlinných olejů je nižší oxidační stabilita, která je způsobena přítomností nenasycených mastných kyselin. Snadno podléhají oxidaci, která vede k vytváření nežádoucích produktů, jako jsou peroxidy a volné radikály, které mohou způsobovat korozi motoru a dále degradaci produktů. Nedávné pokroky ve výzkumu prokázaly potenciální řešení této nevýhody. Dvojně vazby nenasycených mastných kyselin mohou být cíleně přeměněny na epoxidy, které jsou velmi stabilní a mají širokou škálu aplikací v chemickém průmyslu. Mohou být použity k výrobě biolubrikantů, surfaktantů a dalších cenných chemikálií, jako jsou mastné kyseliny, alkoholy a glycerol.

Epoxidy methylesterů mastných kyselin jsou jedním z produktů epoxidace rostlinných olejů. Slouží k výrobě polymerů a kompozitů s lepšími mechanickými, tepelnými a elektrickými vlastnostmi, než polymery získané z petrochemických produktů. Disponují též lepší oxidační stabilitou.

Pozornost výzkumu se v nedávné době začala zaměřovat na enzymatickou epoxidaci za použití lipáz, které mohou katalyzovat tvorbu epoxidů z nenasycených mastných kyselin pomocí perhydrolytického mechanismu. Oproti chemické epoxidaci probíhá tento proces za mírnějších podmínek a dochází k tvorbě stabilních hydroperoxidů přímo z mastných kyselin. Výhodu enzymatické katalýzy je vysoká stereoselektivita, významné potlačení vedlejších reakcí a vysoký stupeň konverze. K tomuto účelu je nejvíce využíváný rekombinantní enzym lipáza *Candida antarctica* B, též známý pod označením *Novozym 435*.

Tato práce má za cíl otestovat využití imobilizovaného enzymu, konkrétně lipázy *Candida rugosa*, pro epoxidaci methylesterů mastných kyselin. Předmětem experimentální práce bylo stanovit aktivitu volné a imobilizované lipázy a ověřit, zda je zvolený enzym účinný pro přípravu epoxidů.

1 Teoretická část

1.1 Enzymy

Pro existenci života jsou definovány dvě základní podmínky, a to schopnost se samovolně replikovat a selektivně i efektivně katalyzovat reakce [1], resp. přeměňovat jednu formu energie na druhou [2]. Enzymy jsou především proteiny, které působí jako biokatalyzátory regulující rychlost chemických reakcí [1–4], aniž by byly v průběhu spotřebovány nebo změněny [4]. Chemické i biologické katalyzátory urychlují reakce na stejném principu, snižují hodnotu aktivační energie [1–3]. Disponují vysokou specifitou a účinností katalyzovaných reakcí, neboť je každá buňka vybavena vlastním geneticky určeným souborem enzymů, což umožňuje koordinované sekvence reakcí, tj. metabolické dráhy [1–4].

1.1.1 Struktura a charakteristika enzymů

Naprostá většina enzymů jsou proteiny, výjimku tvoří několik tříd katalyticky aktivních ribonukleových kyselin, zvané „ribozymy“ [1, 3–5]. Enzymy vykazují globulární strukturu, v nativním stavu tvoří kompaktní sféroidní molekuly, a povahu jednoduchých či složených bílkovin [1, 6]. Enzymy složené z jednoduchých bílkovin nepotřebují k činnosti další složky, kromě svých aminokyselinových zbytků [1]. Naopak bílkovinná část složených enzymů, označovaná jako *apoenzym* (obr. 1), je katalyticky neaktivní. Apoenzym s navázanou nebílkovinnou složkou, *kofaktorem*, tvoří *holoenzym*, tj. aktivní enzym [1, 2, 7]. Některé enzymy jsou kovalentně modifikovány dalšími procesy, jako je fosforylace nebo glykosylace, které se podílí na regulaci jejich aktivity [1, 8].

Kofaktorem mohou být ionty kovů, organické či metalo–organické molekuly, označované jako *koenzymy*. Ionty kovů (např. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) jsou na apoenzym navázány pouze po dobu katalýzy nebo trvale [1, 3, 8]. Koenzymy bývají s enzymem vázány volně (např. NAD(P)^+ , benzochinony) a většina je odvozena od vitamínů [1, 3, 8]. Působí jako přechodné nosiče specifických funkčních skupin, resp. asociují s enzymem jako ko-substráty [8], a musí být regenerovány jinou enzymatickou reakcí [5]. Enzymy, využívající stejný koenzym, obvykle katalyzují reakce podobnými mechanismy [2, 9]. Je-li kofaktor navázán na enzym velmi pevně, často kovalentně, je označován jako *prostetická skupina*. Příkladem je FAD, hem a cytochromy [1, 3, 5], které je obtížné odstranit bez poškození enzymu [10].



Obrázek 1: Strukturní komponenty molekuly enzymu

1.1.2 Interakce enzym-substrát

Zcela zásadní pro katalytickou aktivitu enzymu je aktivní místo [1–3], které tvoří pouze malou část molekuly [2, 6, 7]. Zpravidla se nachází na povrchu či v těsné blízkosti, jelikož musí být přístupné pro molekuly substrátu [9]. Je tvořeno částmi polypeptidového řetězce [11], jehož terciární (popř. kvartérní) struktura udává charakteristické prostorové uspořádání tohoto místa [4, 11, 12]. Obvykle vykazuje tvar štěrbinu, jamky nebo trhliny, který tvoří unikátní třírozměrné mikroprostředí [2, 11]. Povrch je vystlán zbytky aminokyselin se substituenty, které se přímo účastní reakce. Tyto funkční skupiny jsou poskytovány vázanými kofaktory či polypeptidovým řetězcem [1, 7, 9, 11]. V některých případech se na katalýze podílejí zbytky samotného substrátu, tj. anchimerická asistence [12].

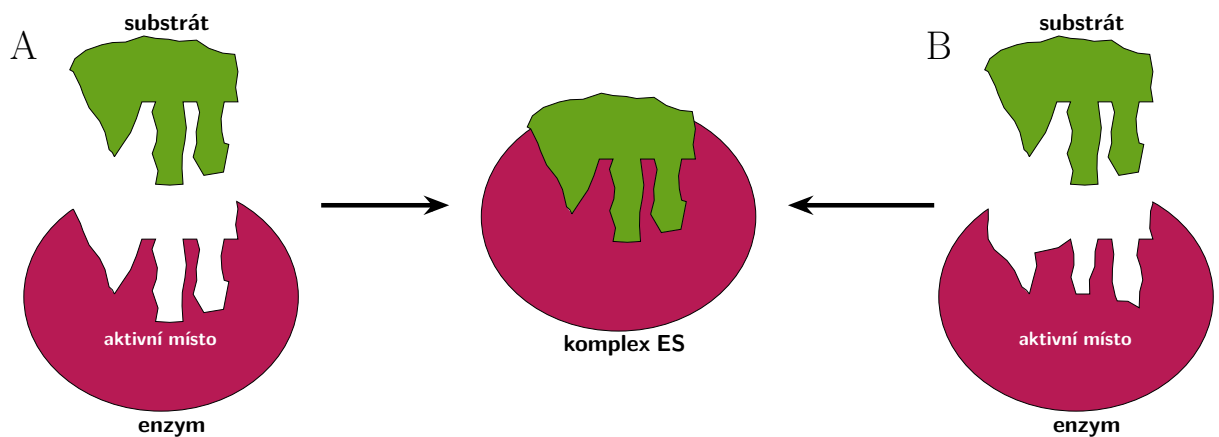
Aktivní místo lze rozlišit na dvě části, vazebné a katalytické místo [6, 11]. Vazebné místo obsahuje přesně rozmístěné funkční skupiny, např. $-SH$, $-OH$, bazické a kyselé aminokyseliny [12], jejichž postavení strukturně a nábojově odpovídá struktuře substrátu [6], tj. geometrická a elektronová komplementarita [1, 5]. Aminokyselinové zbytky mohou interagovat se substrátem pomocí různých interakcí, včetně vodíkových vazeb, van der Waalsových sil, elektrostatických a hydrofobních interakcí [11]. Umožňuje tedy vazbu a správnou orientaci substrátu vůči katalyticky aktivním skupinám [5, 6, 11]. Katalytické místo obsahuje převážně tři aminokyselinové zbytky, které poskytují katalyticky aktivní funkční skupiny [5, 12], jež se přímo účastní na vytváření a štěpení vazeb [5, 6, 11, 12].

Enzymy, vykazující povahu složených bílkovin, mají na svém povrchu v těsné blízkosti aktivního místa lokalizované ještě vazebné centrum k navázání koenzymu. Koenzym zde vstupuje jako druhý reaktant, kosubstrát [5, 6, 13]. Některé enzymy mají na povrchu svých makromolekul několik aktivních center, působících nezávisle na sobě. Zbytek molekuly proteinu hraje roli jako stabilizátor aktivního místa a poskytuje vhodné prostředí pro interakci s molekulou substrátu [6, 13].

Oligomerní enzymy mají na svém povrchu lokalizované tzn. allosterické centrum, jež není součástí aktivního místa. Do tohoto centra se mohou vázat efektory, aktivátory nebo

inhibitory, které indukují konformační změny, čímž modifikují aktivitu enzymu. Tato regulace je nezbytná pro udržení homeostázy, neboť umožňuje kontrolu metabolických drah [3–5].

Základem pro vysvětlení mechanismu enzymatických reakcí je teorie o tvorbě komplexu enzym-substrát, a to Fischerova a Koshlandova teorie (obr. 2). Fischerova teorie, neboli "hypotéza zámku a klíče" [1, 9], byla navržena již v roce 1894, přestože v této době ještě nebyla prokázána bílkovinná povaha enzymů [7, 14]. Tato teorie popisuje specifitu enzymů jako výsledek komplementarity substrátu a aktivního místa, která je zde popisována jako zapadnutí klíče (substrát) do rigidního zámku (aktivní místo) [1, 7, 9]. Nicméně, tato teorie nereflktuje dynamické změny, které provází katalytické transformace, např. vliv allosterických ligandů [9].



Obrázek 2: Grafické znázornění teorií vzniku komplexu enzym–substrát (ES). A) Fischerův model („zámek a klíč“), B) Koshlandův model (indukované přizpůsobení)

Díky pokročilým technikám, jako je rentgenová krystalografie, byla postupně vyvrácena teorie zcela předdefinované rigidní struktury aktivního centra [3, 7]. Což vedlo k rozšíření Fischerovy teorie, kterou představil Koshland jako teorii indukovaného přizpůsobení. Dle této teorie procházejí enzymy při interakci s molekulou substrátu konformačními změnami, jež umožňují enzymu „indukovat“ substrát do aktivního místa [2, 7, 9]. Popisuje zachycení substrátu nejprve na jednu funkční skupinu aktivního centra a následné přiblížení k druhé skupině, se kterou se spojí nekovalentní vazbou, dokud není navázaná celá molekula substrátu. Tímto procesem je postupně utvářena definitivní podoba aktivního místa enzymu [6, 11]. Indukované konformační změny bývají přirovnávány k vložení ruky do rukavice [7, 9]. V současnosti existuje konsensus, že pro některé enzymy je Fischerův model poměrně blízký skutečnosti, na druhou stranu jiné enzymy interakcí se substráty podstupují změnu konformace, která je vhodnější pro katalytickou reakci [1–3].

1.1.3 Specifita enzymů

Specifita je charakteristickým rysem enzymů, která jim umožňuje se selektivně vázat na jednu či více sloučenin a katalyzovat jejich přeměnu na specifický produkt [6, 9]. Právě znamenitá specifita enzymatických katalyzátorů poskytuje živým buňkám schopnost současně provádět a nezávisle kontrolovat široké spektrum biochemických procesů [9]. Existují dva hlavní typy specifity, substrátová a reakční [15]. Všechny enzymy disponují *reakční specifitou*, tj. schopnost katalyzovat určitý typ reakce. Několik enzymů s různou specifitou účinku proto může přeměňovat tentýž substrát na různé produkty [5, 6].

Substrátová specifita popisuje schopnost enzymu katalyzovat přeměnu substrátu na specifický produkt [15]. V aktivním centru je substrát přesně orientován a vázán ve třech bodech [3, 6, 9]. Čímž je substrátová specifita zajišťována na třech úrovních, mezi které patří strukturní, regio- [14, 15] a stereospecifita [5, 6, 9].

Enzymy jsou ovšem poměrně selektivní i na přítomnost chemických skupin na povrchu substrátu, čímž kladou přísnější požadavky na geometrickou specifitu, než na stereospecifitu [5]. Míra této specifity je mezi enzymy variabilní, některé jsou absolutně specifické, jiné skupinově [3, 6, 10]. Většina enzymů však katalyzuje přeměnu pouze úzké skupiny příbuzných sloučenin, liší se ale svou účinností [6]. Naopak pro trávicí enzymy je geometrická specifita spíše preferencí, jelikož katalyzují reakce velkého spektra substrátů [5].

1.1.4 Mechanismus a kinetika enzymatické katalýzy

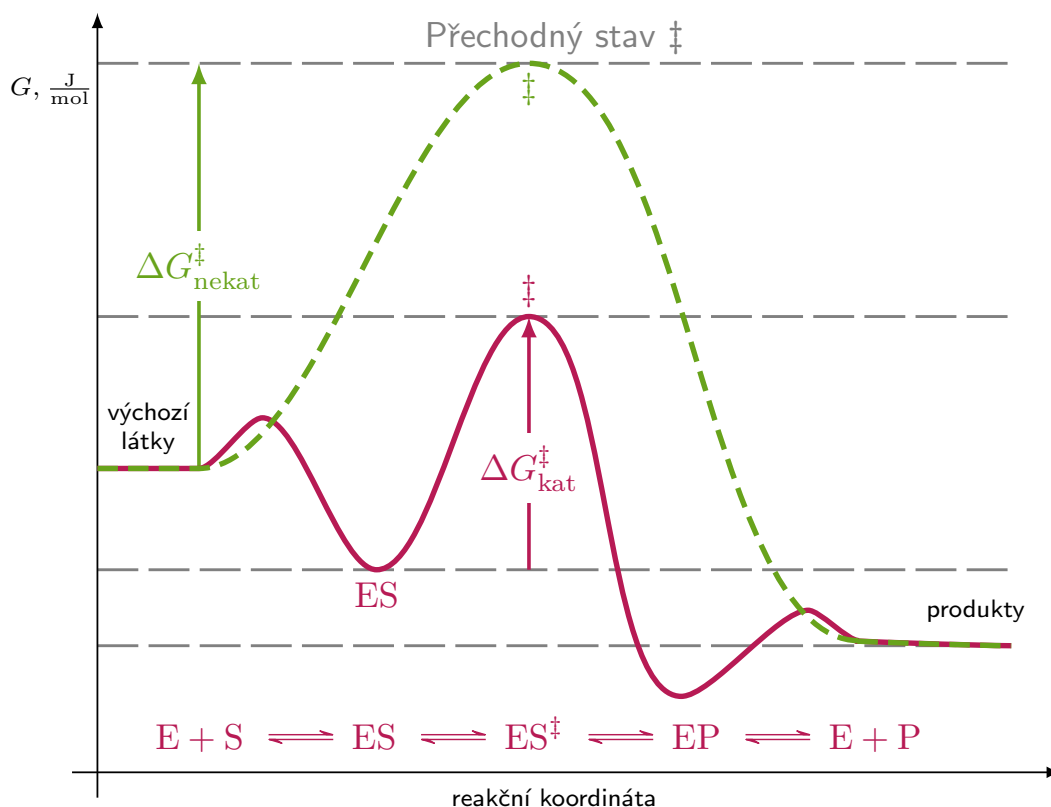
Enzymaticky katalyzované reakce se řídí zákony termodynamiky [3, 10, 16]. První zákon je popisován jako zákon zachování energie, resp. během reakce nemůže být energie vytvořena ani zničena. Druhý zákon je cenným nástrojem k určení termodynamicky příznivé reakce, resp. určení jejího směru [3, 10, 16, 17]. Byla zavedena Gibbsova energie (G), též volná energie [17, 18]. Tato funkce stavu kombinuje termín entalpie, který měří změnu tepla při konstantním tlaku, a termín entropie, který bere v úvahu důležitost náhodného pohybu [3, 17]. Změna volné energie (ΔG) pojednává o spontánnosti a tendenci reakce dospět k rovnováze [17, 18]. Je definována jako rozdíl energie produktů a reaktantů, tudíž není závislá na molekulárním mechanismu transformace [17, 18]. Rozdělení biochemických reakcí podle změny Gibbsovy energie je znázorněno v tabulce 1.

Tabulka 1: Význam hodnoty změny volné energie (ΔG)

| Hodnota ΔG | Směr reakce | Popis reakce |
|--------------------|----------------------|--------------------------|
| kladná | \leftarrow | endergonická, anabolická |
| 0 | \rightleftharpoons | v rovnováze |
| záporná | \rightarrow | exergonická, katabolická |

Enzymy katalyzují reakce na stejném principu jako ostatní katalyzátory, a to snížením aktivační energie bez ovlivnění rovnováhy reakce [5, 11]. Zprostředkovávají energeticky méně náročnou cestu od substrátů k produktům, ale neovlivňují celkovou změnu volné energie reakce, ΔG [5]. Avšak mechanismus enzymatické katalýzy je velmi složitý proces zahrnující několik kroků [3, 10]. Obecně lze říct, že zahrnuje tři základní kroky: vazbu substrátu, přeměnu vázaného substrátu na vázaný produkt a uvolnění produktu [4, 11].

K popisu reakčního mechanismu je příhodné sestavit diagram přechodného stavu, který popisuje závislost Gibbsovy energie na reakční koordinátě [3–5], viz. obrázek 3. Reakční koordináta nemá zpravidla přesný fyzikální význam, představuje pouze postup od reaktantů k produktům. Nicméně, souvisí s mírou transformace vazby, jako je přerušení nebo vytvoření nové vazby [3]. Z diagramu je patrné, že enzym neovlivňuje ΔG reakce, ale pouze energetickou cestu konverze. Na obrázku 3 popisuje $\Delta G^\ddagger_{\text{kat}}$ aktivační energii katalyzované (růžová křivka) a nekatalyzované (zelená křivka) reakce. Tento vysokoenergetický stav odpovídá právě přechodnému stavu (\ddagger).



Obrázek 3: Diagram přechodného stavu

Prvním krokem je přiblížení molekuly substrátu k aktivnímu místu enzymu ve vhodné orientaci pro jeho navázání [5, 11, 16]. Následně dochází k odstranění hydratačního obalu substrátu [16] a vytvoření slabých interakcí mezi enzymem a substrátem [2]. Ačkoliv jsou tyto interakce slabé, jsou zásadní pro samotnou katalýzu, neboť jejich vytvořením dochází k uvolnění vazebné (volné) energie [1, 17]. Funkční skupiny ve vazebném místě tak aktivují substrát [11] a vytvářejí enzym-substrátový intermediát (ES), který zajišťuje správnou prostorovou orientaci [14]. Uvolňuje se tak maximální vazebná energie a snižuje se aktivní energie, ΔG^\ddagger , čímž dochází ke konverzi komplexu enzym–substrát do přechodného stavu [1, 11, 17]. Tento stav se vyznačuje vysokou energií a nestabilitou [6, 11, 17]. Následně dochází ke zhroucení přechodného stavu na produkt a volný enzym [6], skrze komplex enzym–produkt (EP) [4, 5, 11, 16].

Kinetika enzymaticky katalyzovaných reakcí je oborem enzymologie, jehož hlavním cílem je studium reakčních rychlostí [6, 12]. Právě kinetické parametry katalyzované reakce definují *aktivitu* enzymů [12]. Aktivita je vyjadřována jako potřebné množství enzymu k přeměně daného množství substrátu za určitý čas [6] a za daných fyzikálních podmínek [12]. Enzymová kinetika se také zabývá faktory a jejich vlivy na aktivitu enzymů, jako je koncentrace substrátu a enzymu, fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí nebo přítomnost efektorů [6, 12].

1.1.5 Nomenklatura a klasifikace enzymů

V současné době klasifikační systém, který každému enzymu přiřazuje jedinečný kód (EC) a formálnější systematický název [6, 14], obsahuje sedm tříd, a to oxidoreduktázy [6, 13], transferázy, hydrolázy [13, 19], lyázy, izomerázy, ligázy [6, 13, 19] a translokázy [19]. Rovněž je nezbytné uvádět zdroj enzymu, jelikož enzymy s totožnou funkcí mají i stejné číslo EC [6, 14]. Mohou však disponovat rozdílnou katalytickou aktivitou, což je způsobeno odlišností v primární struktuře [8, 13, 14].

Lipázy (triacylglycerol acylhydrolázy, EC 3.1.1.3) jsou ubikvitární enzymy náležící do třídy α, β -hydroláz [20]. Jedná se o glykoproteiny s molekulovou hmotností v rozmezí 20–60 kDa [21]. Primárně hydrolyzují ve vodě nerozpustné triacylglyceroly s dlouhými řetězci mastných kyselin, což je odlišuje od esteráz, na volné mastné kyseliny a glycerol [14]. Také mohou katalyzovat esterifikaci, interesterifikaci, acidolýzu, alkoholýzu a aminolýzu [22]. Aktivní místo lipáz se skládá z katalytické triády, která je tvořena kombinací tří aminokyselinových zbytků, podobné serinovým peptidázám a karboxylesterázám [14]: serin (nukleofilní zbytek), asparagová či glutamová kyselina (katalytický zbytek) a zbytek

histidinu [20]. Předpokládá se, že aktivní centrum obsahuje dvě vazebná místa, jedno pro karbonylovou skupinu acylového donoru a druhé pro nukleofilní substrát [23]. Od esteráz se rovněž odlišují přítomností hydrofobního oligopeptidu, tzv. „víka“, které překrývá aktivní místo. Působením na rozhraní vodné a organické fáze pravděpodobně dochází k jeho pohybu, čímž se aktivní centrum stává dostupné pro molekuly substrátu, tj. mezifázová aktivace [14, 24].

Mechanismus hydrolýzy či syntézy esterů lze rozdělit do několika kroků. Nejprve reaguje molekula substrátu s nukleofilním zbytkem, tvoří tak intermediát, který je stabilizován katalytickým a histidinovým zbytkem. Následně dochází k uvolnění alkoholu a tvorbě kovalentního komplexu acyl–enzym, který je atakován nukleofilem, jako je voda, či alkohol. Což vede k tvorbě intermediátu, který se následně rozpadá na produkt a enzym [14, 20].

1.1.6 Zdroje enzymů

Průmyslově využívané enzymy pochází převážně z hub a kvasinek, dále z bakterií a pouze zlomek je živočišného a rostlinného původu [14, 25]. Až do 70. let 20. století byla většina získávána z kultur rostlinných a živočišných buněk [7]. S rostoucí poptávkou a rozvojem fermentační biotechnologií vzešly na trhu do popředí mikrobiální enzymy [6, 26].

Mezi nesporné výhody využití mikroorganismů patří produkce velkého množství enzymů za krátký čas s konstantním složením mezi jednotlivými šaržemi a nízké náklady [7]. K nadměrné produkci enzymů požadované aktivity a minimalizaci nežádoucích aktivit je velká část mikroorganismů geneticky modifikována [14, 21]. Jedinečné vlastnosti mikrobiálních enzymů, jako je stabilita při různých teplotách a tolerance vůči širokému rozsahu pH, jsou využívány pro průmyslové aplikace a komerční zájmy [6, 21, 25, 26]. K výrobě průmyslových mikrobiálních enzymů bývají nejčastěji využívány houby rodu *Aspergillus* a *Trichoderma*, bakterie rodu *Bacillus* [26, 27], vláknité bakterie rodu *Streptomyces* [14, 26] a kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Candida* [14, 21, 28].

Zatímco enzymy rostlinného a živočišného původu jsou lokalizovány v jednom orgánu nebo tkáni, jako je slinivka břišní, játra, ledviny, části rostlin, tak zbylý materiál tvoří odpad. Potenciálně mohou obsahovat více škodlivých složek (viry, priony), což lze do jisté míry překonat použitím buněčných kultur. Mezi hlavní negativa těchto zdrojů patří časová a ekonomická náročnost následné extrakce a purifikace a také etické problémy [7, 14, 25].

Významný pokrok genového inženýrství umožnil spojení mutací z různých buněčných linií a eliminaci náhodných mutací, které mohou negativně ovlivnit vlastnosti nebo rychlost

syntézy požadovaného enzymu. Genetickou modifikací lze dosáhnout rychlejší syntézy a lepší teplotní i pH stability. Pomocí rekombinantní technologie je v současné době vyráběna většina enzymů používaných v enzymatických procesech [7, 26].

1.1.7 Imobilizace enzymů

Imobilizace enzymů je technika široce používaná v různých oblastech, včetně biotechnologie, lékařství a potravinářského průmyslu, ke zvýšení stability enzymů, usnadnění jejich regenerace a opakovaného použití [14]. Tento proces zahrnuje ukotvení enzymů na pevné nosiče nebo v maticích, čímž lze zabránit jejich difúzi nebo vyluhování do okolního média [29]. Pro komerční využití jsou zejména vhodné imobilizované enzymy, které se vyznačují výhodami, jako je aktivita při různém pH a teplotě, enantiosektivita, vysoká účinnost, snadná výroba, vysoká substrátová specifita, ekologická udržitelnost, biodegradabilita a biokompatibilita [10, 15, 26, 28–33]. Pro imobilizaci je využíváno více metod, z nichž každá disponuje určitými pozitivy a negativy. Výběr způsobu imobilizace enzymu je založena na specifických požadavcích pro danou aplikaci a kompromisu mezi stabilitou, aktivitou, dostupností a cenou [10, 14].

Adsorpce je jednoduchá, reverzibilní a široce používaná metoda. Zahrnuje fyzikální vazbu enzymů na povrch pevných nosičů prostřednictvím nekovalentních vazeb, jako jsou vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, hydrofobní a elektrostatické interakce. Často jsou pro vytvoření slabého kontaktu mezi enzymem a nosičem používány tzv. spacers (prostředníky), např. hexamethyldiamin. Mezi výhody adsorpce patří její jednoduchost, nízká cena a mírné podmínky imobilizace. Navíc umožňuje snadnou obnovu a opakované použití enzymů. Hlavní nevýhodou je však možnost desorpce enzymu v čase (např. změnou pH, teploty, iontové síly), což může omezit stabilitu a opakovanou použitelnost imobilizovaných enzymů [6, 14, 26, 28, 31, 33].

Kovalentní vazba je stabilnější a trvalejší způsob imobilizace. Zahrnuje tvorbu kovalentních vazeb mezi enzymy a pevnými nosiči nebo maticemi [6, 31, 32]. Tato technika se skládá ze tří kroků: aktivace nosiče, navázání ligandu a blokáce reziduálních funkčních skupin [28]. Kovalentní vazba nabízí kontrolu nad orientací a hustotou imobilizovaných enzymů, což může ovlivnit jejich katalytickou aktivitu [33]. Mezi hlavní výhody patří pevné spojení, snadná interakce se substráty a zvýšená tepelná stabilita [26, 31]. Avšak nevýhodou kovalentní vazby je částečné pozměnění aktivních struktur, které může být způsobeno chemickou modifikací enzymu nebo nosiče. Což může mít za následek sníženou aktivitu enzymu nebo omezenou dostupnost substrátů [6, 26, 32].

Zesíťování je zvláštním typem kovalentní vazby, zahrnuje tvorbu kovalentních vazeb mezi molekulami enzymu, buď přímo, nebo s pomocí síťovacího činidla, což vede k vytvoření trojrozměrné sítě [14, 28]. K tomuto účelu se používají bi- nebo polyfunkční činidla, zejména např. glutaraldehyd [6, 26, 34], derivát meleimidu a isokyanát [33], alternativou je např. polyaldehyd dextranu [32]. Tato metoda nabízí zvýšenou stabilitu enzymu, odolnost proti denaturaci a lepší provozní vlastnosti [14, 33]. Agregáty zesíťovaných enzymů (CLEA) jsou jedním příkladem tohoto přístupu, kde dochází k nedenační agregaci a zesíťování pomocí vhodného činidla [14, 35]. Zesíťování však může vést ke snížení aktivity enzymu a bránit přenosu hmoty, což omezuje dostupnost substrátu k aktivním místům [6, 35]. Síťovací činidla taktéž mohou působit toxicky nebo změnit selektivitu enzymu [14, 35].

Zachycení a enkapsulace. Způsoby zachycení, tzv. entrapment, a enkapsulace zahrnují zadržení enzymu uvnitř polymerní matrice či membrány. Při enkapsulaci jsou enzymy zapouzdřeny v semipermeabilní membráně, zatímco při zachycení jsou fyzicky zachyceny v matrici [6, 28]. Polymerní sítě jsou tvořené především z chitosanu, polyakrylamidu, alginátu, celulózy, polyuretanu a dalších polymerů. Tyto metody poskytují enzymům ochranné prostředí, které je chrání před nepříznivými reakčními podmínkami a stabilizuje jejich strukturu [32, 33]. Zachycení a enkapsulace nabízí vysokou kapacitu naplnění a snadnou obnovu enzymů [26]. Hlavní nevýhodou je omezená difúze způsobená maticí, což může snížit dostupnost substrátu a reakční rychlosti [6, 15, 26, 35]. Tyto vlastnosti jsou společné s adsorpcí.

Chelatace zahrnuje vazbu enzymů na pevné nosiče prostřednictvím koordinace kovových iontů. Kovové ionty, jako je vápník, měď nebo zinek, interagují se specifickými aminokyselinovými zbytky enzymu a vytvářejí stabilní komplexy enzym–kov. Tyto organokovové kostry (z angl. Metal-organic frameworks, MOFs) tvoří trojrozměrné porézní krystaly, proto je možné chelataci označit za zvláštní typ metody zachycení. Tato metoda umožňuje zachování aktivity enzymu v širokém rozsahu podmínek, kontrolu nad místem imobilizace a orientací enzymu, resp. nabízí vysokou stabilitu. Avšak dostupnost vhodných kovových iontů a jejich kompatibilita s daným enzymem mohou být limitujícími faktory [31, 32].

1.1.8 Využití enzymů

Enzymy hrají klíčovou roli při rozvoji ekologicky šetrných postupů napříč průmyslovými odvětvími. V oblasti potravinářství jsou využívány při výrobě rybí omáčky [26, 36], masných produktů [21, 26, 37, 38], sýrů a bezlaktózových výrobků [14, 26, 32, 38, 39], piva a whisky [40, 41] a zpracování ovocných šťáv [14, 26, 32].

Ve farmaceutickém průmyslu slouží k výrobě beta-laktamových antibiotik [42]. Enzymy mají také široké spektrum aplikací v lékařství a diagnostice, kde slouží k léčbě různých genetických a metabolických onemocnění a rakoviny [43]. Terapeutické enzymy slouží také jako trombolytika a antikoagulancia [37, 43, 44]. Lipáza *Candida rugosa* se využívá k syntéze lovastatinu, který snižuje hladinu cholesterolu [37].

V textilním průmyslu vykazují enzymatické procesy pozitivní vliv na úpravu textilií, zvyšují měkkost a usnadňují barvení [14, 21, 37]. Například lipázy a proteázy jsou běžnou součástí čistících a pracích prostředků [21, 26, 37, 42]. V oblasti výroby papíru přinášejí výhody, jako je vyšší bělost, snížení množství chemikálií a znečištění [14, 21, 37, 45]. Biokatalyzátory nacházejí uplatnění i v oblasti průmyslové chemie [14, 21, 26, 37, 42, 45]. Využití enzymů v oblasti oleochemie je popsáno v následujících kapitolách 1.2.2 a 1.2.3.

1.2 Oleje a tuky

Oleje a tuky jsou jednoduché lipidy složené z alkoholu a kyseliny, konkrétně z esterů glycerolu a tří mastných kyselin (MK) [1, 4]. Tyto lipidy, též nazývané triacylglyceroly, se dále dělí na jednoduché, obsahující pouze jeden typ MK, a smíšené acylglyceroly, které obsahují více typů MK [1]. Triacylglyceroly jsou nepolární, viskózní a ve vodě nerozpustné sloučeniny [4]. Příslušné mastné kyseliny jsou až na výjimky nevětvené se sudým počtem atomů uhlíku. Obecně se MK dělí podle:

- délky uhlíkového řetězce, tedy počtu atomů uhlíku (C), na krátké (méně než C6), středně dlouhé (C6–C12), dlouhé (C14–C20) a velmi dlouhé (nad C20),
- nasycenosti na nenasycené a nasycené mastné kyseliny.

Nasycené mastné kyseliny jsou charakterizovány dlouhými nevětvenými řetězci. Mezi nejčastější nasycené MK patří kyselina máselná (C4), laurová (C12), myristová (C14), palmitová (C16), stearová (C18) a arachová (C20) [1, 4, 5].

Naopak v řetězci nenasycených mastných kyselin se vyskytuje jedna nebo více dvojných vazeb, jsou tzv. mono- či polynenasycené. V polynenasycených MK jsou dvojně vazby vždy lokalizovány na každém třetím atomu uhlíku, jsou tzv. izolované. Je-li řetězec číslován od karboxylového konce (tzn. α -uhlíku), pak je uváděna pozice uhlíku nesoucího dvojnou vazbu jako Δ . Naopak u číslování od methylového konce je příslušný atom uhlíku zapisován jako ω [4, 5]. Příklady nenasycených MK jsou uvedeny v tabulce 2. V přírodě se tyto MK vyskytují nejčastěji v cis konfiguraci, kde jsou substituenty na stejné straně, zatímco trans-izomery jsou součástí ztužených tuků [1, 4, 5].

Tabulka 2: Příklady nenasycených mastných kyselin

| Počet atomů uhlíku:dvojných vazeb | Triviální název | Poloha dvojných vazeb od: | |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | | ω -uhlíku | α -uhlíku |
| C16:1 | Palmitolejová | ω 7 | Δ 9 |
| C18:1 | Olejová | ω 9 | Δ 9 |
| C18:2 | Linolová | ω 6 | Δ 9, 12 |
| C18:3 | α -linolenová | ω 3 | Δ 9, 12 |
| C20:4 | Arachidonová | ω 6 | Δ 5, 8, 11, 14 |

Tuky jsou pevné, jelikož ve struktuře převažují dlouhé nasycené řetězce, které mohou vytvářet větší množství Van der Waalsových sil, což vede ke vzniku pravidelné polokrystalické struktury [4, 46]. Oleje jsou viskózní kapaliny a jejich struktura je převážně tvořena nenasycenými mastnými kyselinami. Přítomnost dvojných vazeb v cis konfiguraci způsobuje zakřivení prostorového uspořádání molekuly, což vede ke vzniku méně pravidelné a více dynamické struktury [4, 5, 46]. Bod tání tuků a olejů roste s rostoucím počtem atomů uhlíku v nasyceném řetězci [5, 46] a klesá s rostoucím stupněm nenasycenosti, resp. počtem dvojných vazeb [4, 5, 46].

Tuky jsou spojovány zejména s živočišnými zdroji, zatímco oleje s rostlinnými. Rostlinné oleje a tuky jsou získávány především ze semen jednoletých rostlin, např. řepka olejka, slunečnice. Dalším nepostradatelným zdrojem jsou plody olejodárných stromů, mezi něž patří např. kokosovník ořechoplodý, palma olejná, olivovník. Nespornou výhodou těchto stromů je nenáročnost na pěstování a dlouhověkost v rámci desítek let. Tyto zdroje jsou bohaté na nenasycené tuky, včetně mono- a polynenasycených tuků, které jsou spojovány s mnoha zdravotními přínosy. Živočišné tuky disponují převážně nasycenými MK a jsou získávány z tkání či produktů zvířat, jako je dobytek, prasata a ovce [47].

1.2.1 Využití olejů a tuků

Tuky a oleje nacházejí využití v různých odvětvích průmyslu díky svým unikátním vlastnostem. V potravinářství jsou nepostradatelnou surovinou, lze tak je rozdělit na jedlé a nejedlé. Oleje, např. olivový, slunečnicový a řepkový, se používají od smažení po výrobu dresinků a majonéz, čímž přidávají jídlu charakteristickou chuť a texturu. Navíc tuky, jako máslo a sádlo, zlepšují chuť a texturu pečiva [48]. V kosmetickém průmyslu jsou, např. mandlový a makadamový olej a kakaové máslo, součástí produktů pro péči o pleť díky jejich hydratačním a zjemňujícím vlastnostem [49].

Přeměny rostlinných olejů se může účastnit buď esterová skupina, nebo dvojná vazba mastných kyselin:

- **Esterová funkční skupina** může být předmětem hydrolyzy či transesterifikace. Hydrolyzou triacylglycerolů vzniká glycerol a mastné kyseliny, jejichž karboxylová skupina se stává dostupnou pro další reakce [22]. Mohou tak být přeměněny na estery, alkoholy [50], aminy [51, 52] a amidy [52] MK. Například alkoholy MK slouží jako surfaktanty [53].
Transesterifikací mastných kyselin vznikají methylestery MK, tzn. biodiesel, který je neznámějším produktem přeměny rostlinných olejů. Biodiesel má mnoho výhod oproti konvenčnímu naftovému palivu, včetně snížení závislosti na fosilních palivech a nižších emisí (CO_2 a SO_2). Je netoxický a biologicky odbouratelný [54, 55]. Přímé použití rostlinných olejů v palivových motorech je vzhledem k jejich vysoké viskozitě problematické, jelikož může vést k tvorbě usazenin ve vstřikovači paliva [46, 53].
- **Dvojná vazba** nenasycených MK, resp. jejich methylesterů, může být předmětem hydrogenace [50] a epoxidace [52, 54]. Epoxidy MK nacházejí uplatnění v průmyslu polymerů jako stabilizátory a plastifikátory. Také slouží jako vstupní surovina syntézy polyuretanů, karbonylových sloučenin a polyalkoholů [51, 56, 57] nebo jako lubrikanty [58].

Vedlejším produktem zmíněných reakcí je glycerol, který po přečištění nachází uplatnění v potravinářském [59], farmaceutickém [60] a kosmetickém průmyslu [47, 59, 60]. Slouží jako vstupní surovina výroby polyuretanu, polyesteru či propylen glykolu [52, 53, 61]. Vzhledem k zaměření práce budou kapitoly transesterifikace (1.2.2) a epoxidace (1.2.3) rostlinných olejů věnovány především popisu enzymatické katalýzy.

1.2.2 Enzymatická transesterifikace rostlinných olejů

Transesterifikace zahrnuje sérii po sobě jdoucích reakcí olejů s alkoholem, zejména methanolem a ethanolem [55, 62], jako meziprodukty vznikají di-/monoglyceridy [62]. Může být katalyzována kyselinami, zásadami nebo enzymy [63, 64]. V komerční výrobě převládá bazická katalýza, která je rychlá a dosahuje vysokých výtěžků [59, 63]. Mezi její hlavní nevýhody patří např. tvorba mýdla [63], senzitivita na přítomnost vody a vysoká spotřeba energie [47, 59, 62].

Nevýhody konvenčních chemických metod vedly k rozvoji využití enzymů, především lipáz, jako katalyzátorů transesterifikace [63, 65]. Enzymatická transesterifikace nabízí výhody, jako je vysoký výtěžek a čistota biodieselu, tolerance vůči obsahu vody a volných MK v oleji, jednodušší výrobní procesy, nižší spotřeba energie, snadná separace a recyklace enzymů [63, 64]. Nicméně nevýhodou této metody je podstatně nižší reakční rychlost oproti bazicky katalyzované transesterifikaci [47, 59, 65], citlivost lipáz na přítomnost vysoké koncentrace methanolu [59, 63, 66] a finanční náklady, spojené zejména s komerčními enzymy [67]. Nejčastěji se používají imobilizované lipázy, což umožňuje jejich opakované využití a napomáhá překonat nedostatky, jako je reziduální aktivita enzymu a ekonomické náklady [65]. Vysokého stupně konverze (přes 90%) bylo dosaženo u imobilizovaných lipáz, např. *Burkholderia cepacia* [68], *Candida rugosa* [69–71] a *Candida antarctica* [72].

1.2.3 Enzymatická epoxidace rostlinných olejů

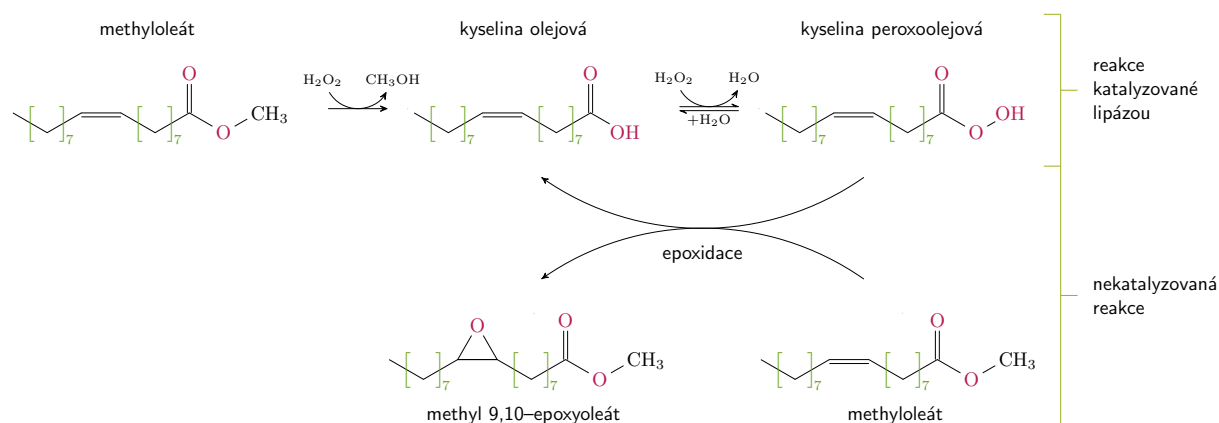
Epoxidace rostlinných olejů a z nich připravených esterů získala v posledních letech významnou pozornost díky svému potenciálu pro výrobu cenných sloučenin s různými průmyslovými aplikacemi [73, 74]. Mechanismus epoxidace je založen na tvorbě peroxokyseliny pomocí příslušného katalyzátoru a oxidovadla, ze které je přenášen atom kyslíku na dvojnou vazbu a tvoří oxiran [66, 73–76]. Epoxidová funkční skupina se vyznačuje značnou reaktivitou, která je způsobena pnutím v oxiranovém kruhu [51]. Obecně platí, že většího množství oxiranu se dosáhne s oleji s vyšším obsahem nenasycených MK [51, 73]. Na rozdíl od tradičních chemických metod, které zahrnují více reaktantů a generují odpadní produkty, představuje enzymatická epoxidace udržitelnější a ekologičtější alternativu [51, 66, 73].

Předností enzymů je, že jsou biologicky odbouratelné a vykazují vysokou selektivitu k určitým substrátům, což umožňuje produkci požadovaných epoxidů s vysokou čistotou, tedy s minimálním množstvím vedlejších produktů [67, 77, 78]. Navíc probíhají za mírných podmínek [77, 78], včetně pokojové teploty a atmosférického tlaku [74], což minimalizuje spotřebu energie a provozní náklady [77].

Avšak enzymatická epoxidace má i svá omezení, obdobná enzymatické transesterifikaci (nízká reakční rychlost, denaturace, ztráta katalytické aktivity, vysoká cena). Nicméně, metody proteinového inženýrství [79, 80], imobilizace a techniky recyklace přinášejí slibné výsledky při zlepšování výkonu enzymů a účinnosti reakce [73, 81]. Jednou z hlavních výzev je dostupnost vhodných enzymů, které jsou schopné efektivně katalyzovat epoxidaci. Volba enzymu je závislá zejména na jeho substrátové specifitě a katalytické aktivitě.

Enzymy s vyšší regio- a stereoselektivitou, stejně tak stabilitou a recyklovatelností, jsou zvláště žádoucí [51, 67, 73, 74]. Parametry, jež jsou zmíněné v následujících odstavcích, a další reakční podmínky ovlivňující enzymatickou epoxidaci shrnuje tabulka 3. Tvoří tak přehled dosavadních vybraných studií enzymatické epoxidace rostlinných olejů.

Nejvíce studovaným a používaným enzymem je lipáza *Candida antarctica* B, zejména v imobilizované formě jako Novozym 435 [56, 57, 66, 74, 76, 78, 82–86]. Lipázy obsahují v aktivním centru katalytickou triádu [23], viz. kapitola 1.1.5, a mohou hydrolyzovat triacylglyceroly na glycerol a volné mastné kyseliny, jež mohou dále reagovat s peroxidem vodíku a vytvářet tak peroxokyseliny (obr. 4). Následná epoxidace dvojně vazby probíhá bez enzymatické asistence, často bývá označována jako samo-epoxidace [23, 56, 58].



Obrázek 4: Enzymatická samo-epoxidace methyloléátu

Vliv teploty a koncentrace peroxidu vodíku. Teplota a koncentrace peroxidu vodíku jsou klíčové parametry, které ovlivňují rychlost reakce a přeměnu substrátu. Nižší teploty ($\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a střední koncentrace peroxidu vodíku, molární poměr $\text{H}_2\text{O}_2/\text{C}=\text{C}$ v rozmezí 3:1–6:1, mají minimální vliv na aktivitu enzymu [58, 67, 84], zatímco vysoké koncentrace (více než 6:1 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{C}=\text{C}$) za zvýšené teploty (nad $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) vedou k lineárnímu poklesu jeho stability a efektivity [58, 73, 84]. Postupný a kontrolovaný přídavek peroxidu vodíku se osvědčil k udržení stability enzymu [58, 87], naopak pokusy jej nahradit (např. močovina-peroxid vodíku [67], *t*-butylhydroperoxid [88]) nejevily rozdíl v inaktivaci enzymu [77]. Teploty nad $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ mohou vést k rozkladu peroxidu vodíku, poklesu či ztrátě aktivity enzymu [56, 73], vlivem přijetí otevřenější konformace [56, 67]. Nicméně, lipáza *Candida antarctica* B projevila určitou stabilitu i nad $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ [56]. U imobilizovaných lipáz je aktivita zvláště ovlivněna při teplotách nad $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ v přítomnosti peroxidu vodíku, což zdůrazňuje nepříznivých vliv vysokých koncentrací peroxidu vodíku a zvýšených teplot na efektivitu lipázy [67, 73, 87].

Přídavek volné mastné kyseliny do reakční směsi zvyšuje výtěžek epoxidace a potlačuje případné vedlejší reakce [76, 82], jako je hydrolyza a dihydroxylace reakčních produktů (mono- a diglyceridů), které mohou snižovat kvalitu výsledného produktu [73].

Vliv rozpouštědla. Většina dosavadních studií [51, 56, 58, 67, 73, 74, 82, 86, 89] zaměřených na enzymatickou epoxidaci využívá ke snížení inaktivace enzymu nepolární organická rozpouštědla, která snižují přímý kontakt mezi enzymem a oxidovadlem. Čímž zvyšují stabilitu enzymu a kinetiku reakce a umožňují opakovatelné použití [58, 73, 83]. Toluén [57, 66, 76, 78, 84–86] a další organická rozpouštědla, jako je ethylacetát [22] nebo dichlormethan [56], vykazují uspokojivé výsledky, přesto by mělo být jejich použití zváženo s ohledem na související náklady výroby, používání a likvidace [73, 89]. Bezrozpouštědlové procesy eliminují potřebu dalších chemikálií, jsou environmentálně výhodné, ale mohou vést ke ztrátě aktivity enzymu [67, 74, 82, 83]. Nicméně, Novozym 435 prokázal v bezrozpouštědlovém systému vynikající znovupoužitelnost a zachování enzymatické aktivity [74, 82, 83].

Tabulka 3: Přehled reakčních podmínek vybraných studií zabývajících se enzymatickou epoxidací rostlinných olejů

| Enzym | Substrát | Teplota, °C | Čas, hod | Přídavek mastné kyseliny | Oxidovadlo | Rozpouštědlo | Množství enzymu | Otáčky, rpm | Konverze, % | Ref |
|--|--|-------------|----------|--|--|--|-----------------------------|-------------|--------------|------|
| Novozym 435 | sojový olej | 35 | 24 | - kys. olejová (8 % hm.) kys. stearová (8 % hm.) | H ₂ O ₂ (MP 2:1) | - | 4 % hm. | 400 | 84 99 | [82] |
| | sojový olej (ME) | 55 | 24 | kys. behenová (0,01 mol) | 14 g 35% H ₂ O ₂ | toluen | 0,4 % hm. | 800 | 6.75 | [66] |
| | řepkový olej | RT | 16 | různé (5 % mol.) | H ₂ O ₂ (MP 1,5:1) | toluen | 0,05 mol C=C/g enzymu | - | 91 | [76] |
| | slunečnicový olej | | | | | | | | 88 | |
| | sojový olej | | | | | | | | 93 | |
| | lněný olej | | | | | | | | 96 | |
| | hroznový olej (ME) | 45 | 16 | kys. laurová (1 mmol) | 30% H ₂ O ₂ (1 ml) | toluen, voda | 100 mg | 250 | 99 | [78] |
| | SMSO | 50 | 7 | kys. stearová | H ₂ O ₂ (MP 4:1) | toluen | 2 % hm. | 800 | 90.2 | [84] |
| | TOFA | 44 | 5.5 | - | H ₂ O ₂ (MP 2:1) | - | 3,3 % hm. | 450 | 73 | [74] |
| | sojový olej | 50 | 24 | kys. olejová (8 % hm.) | H ₂ O ₂ (MP 2:1) | toluen | 4 % hm. | 350 | 98 | [85] |
| | slunečnicový olej (ME, 1 g) | 30 | 24 | kys. oktanová (10 mmol) | 30% H ₂ O ₂ (1 ml) | CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O | 100 mg | - | 90 99 | [56] |
| | hroznový olej (ME, 1 g) | 45 | 16 | - | 30% H ₂ O ₂ (1 ml) | toluen | 100 mg | 130 | 96.67 | [86] |
| | sojový olej | 40 | 5 | - | 30% H ₂ O ₂ (MP 1,5:1) | toluen | 4 % hm. | 200 | 91 | [57] |
| | TOFA | 42 | 7 | - | 32% H ₂ O ₂ (MP 1,9:1) | - | 3 % hm. | 450 | 81.5 | [83] |
| lipáza <i>Candida sp.</i> | | | | | | | | | 16.4 | |
| lipáza <i>Candida rugosa</i> | | | | | | | 15 000 LU/100 g TOFA | 450 | x | [83] |
| lipáza <i>Mucor javanicus</i> | TOFA | 42 | 7 | - | 32% H ₂ O ₂ (MP 1,9:1) | - | | | x | |
| lipáza <i>Rhizopus niveus</i> | | | | | | | | | x | |
| lipáza <i>Porcine pancreas</i> | | | | | | | | | x | |
| Peroxygenáza <i>Collariella virescens</i> | kyselina olejová, linolová, linolenová (0,1 mM) | 30 | 0.5 | - | 1,25 mM H ₂ O ₂ | aceton, PBS (pH 7) | 0,25-0,4 μM | - | 96-97 | [80] |
| PSCI-Amano lipáza <i>Burkholderia cepacia</i> | kyselina olejová, methyloleát | 55 | 3 | - | 0,2 % hm. H ₂ O ₂ | ethylacetát | 10 % hm. | 150 | 88 | [22] |
| peroxygenáza <i>Avena sativa</i> | methyloleát kyselina olejová | 20 | 24 | - | t-butylhydroperoxid | HEPES | - | - | 93.9 99.8 | [88] |

Význam zkratk: laboratorní teplota (RT), nedefinováno (-), žádný produkt (x), molární poměr H₂O₂ ke dvojnásobné vazbě (MP), methylester (ME), imobilizovaná lipáza *Candida antarctica* B (Novozym 435), talový olej (TOFA), N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina (HEPES), Amano lipáza PS imobilizovaná na keramice (PSCI), ostropestřecový olej (SMSO, *Silybum marianum* L. seeds oil)

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie a materiály

Přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Magnetický separátor (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- pH metr Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- UV/Vis spektrofotometr Libra S22, Peltierův termostat (Biochrom, Cambridge, VB)
- Spektrofotometr PowerWave™ HT, software Gen5 (BioTek, Vermont, USA)
- Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací Nicolet iS50, software Omnic (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destičky, 96 jamek (PP, P-Lab, ČR)

Chemikálie:

- Deionizovaná a ultračistá voda
- Enzym lipáza *Candida rugosa* Type VII, ≥ 700 IU/mg (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Kyselina chlorovodíková – 36% (Penta, Chrudim, ČR)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris, čistota p.a. (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- 4-nitrofenylbutyrát – NPB, $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Jodistan sodný (NaIO_4) – čistota p.a. (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného – čistota p.a. (Lachner, Neratovice, ČR)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného – čistota p.a. (Lachner, Neratovice, ČR)

- Glutaraldehyd – 50% (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Standard methylesteru kyseliny olejové – 99% (Sigma Aldrich, Missouri, USA)
- Methylester řepkového oleje (MEŘO) – 57,2 % ME kyseliny olejové
- Peroxid vodíku – 30% (Penta, Chrudim, ČR)

Magnetické částice:

- Magnetická makroporézní perlová celulóza – porozita 200, –OH funkční skupiny, velikost částic 80–100 μm , stabilizovaná v 0,05% NaN_3 (IONTOSORB, Ústí nad Labem, Česká republika)

Roztoky:

- 0,1M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,2M NaIO_4
- 2,5% glutaraldehyd v uhličitanovém pufru (0,1M, pH 9,4)
- Zásobní roztok lipázy *C. rugosa* (2 mg/ml) ve fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,3)
- Zásobní roztok 50mM NPB (v acetonitrilu)
- 0,1mM Tris–HCl pH 7,4
- 0,1M HCl

2.2 Imobilizace lipázy *Candida rugosa*

2.2.1 Imobilizace lipázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu

Imobilizace na magnetické částice makroporézní perlové celulózy sestávala ze dvou kroků, oxidace hydroxylových funkčních skupin částic a následného navázání enzymu. Nejprve bylo pomocí magnetického separátoru odebráno 500 μl sedimentovaného nosiče, který byl 10x promyt ultračistou vodou, aby byl odstraněn stabilizační roztok. K sedimentovanému nosiči bylo poté napipetováno 500 μl oxidačního roztoku 0,2M NaIO_4 , následovala inkubace 90 min při laboratorní teplotě ve tmě za mírného otáčení. Po oxidaci byly částice 10x promyty ultračistou vodou. K částicím byl následně přidán roztok 125/250/500 μg lipázy v 1 ml fosfátového pufru (0,1M, pH 7,3). Takto připravená směs byla inkubována 18 h při 4 °C na rotátoru. Následně byl odstraněn supernatant a částice byly 10x promyty fosfátovým pufrem (0,1M, pH 7,3), ve kterém byly částice s imobilizovanou lipázou pro další použití skladovány při teplotě 4 °C.

2.2.2 Imobilizace lipázy na jamky mikrotitrační destičky

Povrch jamek mikrotitrační destičky byl nejprve upraven roztokem 2,5% glutaraldehydu v 0,1M uhličitanovém pufru pH 9,4 (200 μ l/jamka). Po 2hod inkubaci při laboratorní teplotě byl tento roztok odstraněn. Do jamek bylo napipetováno 200 μ l roztoku lipázy o koncentraci 75/100/150/200 μ g ve fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,3). Následovala inkubace 20 hod při teplotě 4 °C. Následně byla destička promyta nejprve 5x destilovanou vodou, poté 5x roztokem fosfátového pufru (0,1M, pH 7,3). Takto imobilizovaná lipáza byla skladována pro následné využití ve fosfátovém pufru (0,1M, pH 7,3) při teplotě 4 °C.

2.3 Měření hydrolytické aktivity lipázy

Pro každou sérii měření byl připraven čerstvý zásobní roztok p–nitrofenylbutyrátu (NPB) v acetonitrilu o koncentraci 50 mM. Tento zásobní roztok byl dále zředěn na požadovanou koncentraci pro 1 ml reakční směsi, obsahující solubilní či imobilizovanou lipázu a Tris–HCl (0,1mM, pH 7,4). Aktivita enzymu byla měřena monitorováním produktu, p–nitrofenolu, enzymatické hydrolýzy p–NPB v prostředí Tris–HCl při 37 °C. Absorbance byla měřena při 405 nm po celkovou dobu 60 min v intervalech 2 minut na UV/Vis spektrofotometru Libra S22 s Peltierovým článkem nebo spektrofotometru PowerWave™ HT. Následně byly hodnoty graficky zpracovány v programu Excel.

Roztoky obsahující 0,05/0,1/0,2/0,5/0,75/1/2 a 5 μ g/ml lipázy v Tris–HCl byly připraveny do jamek mikrotitrační destičky, které byly temperovány na 37 °C. K těmto roztokům bylo následně napipetováno příslušné množství NPB, aby jeho koncentrace v 200 μ l byla 0,25/0,68/1,1 mM. Průběh všech reakcí byl proměřován současně na spektrofotometru PowerWave™ HT se softwarem Gen5.

2.3.1 Aktivita imobilizované lipázy

Aktivita lipázy imobilizované na magnetických částicích

Měření bylo prováděno na UV/Vis spektrofotometru Libra S22 s Peltierovým článkem. Proměřeno bylo 6 reakčních směsí o objemu 1 ml a koncentraci imobilizované lipázy na magnetických částicích 5, 10, 12,5, 20, 25 a 50 μ g/ml v Tris–HCl a 0,75 mM NPB při teplotě 37 °C. Do kyvety bylo napipetováno příslušné množství Tris–HCl a 0,75 mM NPB, po proměření absorbance byl tento roztok okamžitě přenesen do mikrozkuřavky typu Eppendorf obsahující magnetické částice s imobilizovanou lipázou o příslušné koncentraci. Tyto mikrozkuřavky byly umístěny na třepačku Thermo–Shaker TS-100, kde byla reakční

směs v časovém intervalu 2 min temperována (37 °C) a míchána (450 rpm). Každé 2 min byl roztok bez magnetických částic, které byly separovány magnetickým separátorem, přenesen do kyvety k měření. Takto probíhalo měření po dobu 60 min či do překročení přístrojem měřitelné absorpance.

Aktivita lipázy imobilizované na jamky mikrotitrační destičky

Množství roztoku 0,75mM NPB a Tris–HCl bylo přizpůsobeno objemu 200 μ l. Měření průběhu reakce bylo provedeno na spektrofotometru PowerWave™ HT, s integrovaným softwarem Gen5. Při tomto procesu nebylo nutné reakční směs přenášet, jelikož tento spektrofotometr disponuje termostatem i integrovanou třepačkou.

2.4 Enzymatická epoxidace mastných kyselin

Epoxidace byla prováděna v mikrotitrační destičce s imobilizovanou lipázou o koncentraci 75, 100, 150 a 200 μ g. Jako oxidovadlo sloužil peroxid vodíku (30%), který byl použit v molárním poměru (MP) ke dvojným vazbám 1:1 a 1,5:1. Ke srovnání sloužila upravená jamka 2,5% glutaraldehydem (v 0,1M uhličitanovém pufru pH 9,4), pipetáž reagentů byla shodná jako pro vzorky.

K imobilizované lipáze byl do jamek přidán standard methyloleátu (99%), pro MP 1:1 bylo napipetováno 150 μ l a pro MP 1,5:1 134 μ l methylesteru. Takto připravená destička byla umístěna na Thermo–Shaker TS-100, kde byla míchána při 450 rpm a temperována na 40 °C. Po inkubaci byl v krátkých časových intervalech přidáván peroxid vodíku (během 10 min), pro MP 1:1 bylo celkem přidáno 50 μ l a pro MP 1,5:1 66 μ l 30% H₂O₂. Směs byla ponechána reakci po dobu 4 hod, za neustálého míchání (450 rpm) a při konstantní teplotě 40 °C. Po této době byla směs z jamek odebrána, zcentrifugována a odstraněna vodná fáze. Odebrané vzorky byly následně analyzovány IČ spektrometrií. Mikrotitrační destička s navázanou lipázou byla promyta fosfátovým pufrům (0,1M, pH 7,3), ve kterém byla následně uchovávána (při 4 °C) pro stanovení reziduální aktivity enzymu.

2.5 Analýza výsledků epoxidace metodou FT–IR

Za účelem určení funkčních skupin byl použit infračervený spektrometr s Fourierovou transformací (FT–IR) Nicolet iS50 s integrovaným softwarem Omnic a s jednodrazovým diamantovým ATR modulem. Na ATR modul bylo odpipetováno 50 μ l vzorku, měření bylo provedeno s ATR korekcí, počtem skenů 32 a rozlišením 1 cm⁻¹. Vyhodnocení spekter bylo provedeno pomocí Python knihovny Matplotlib.

3 Výsledky a diskuse

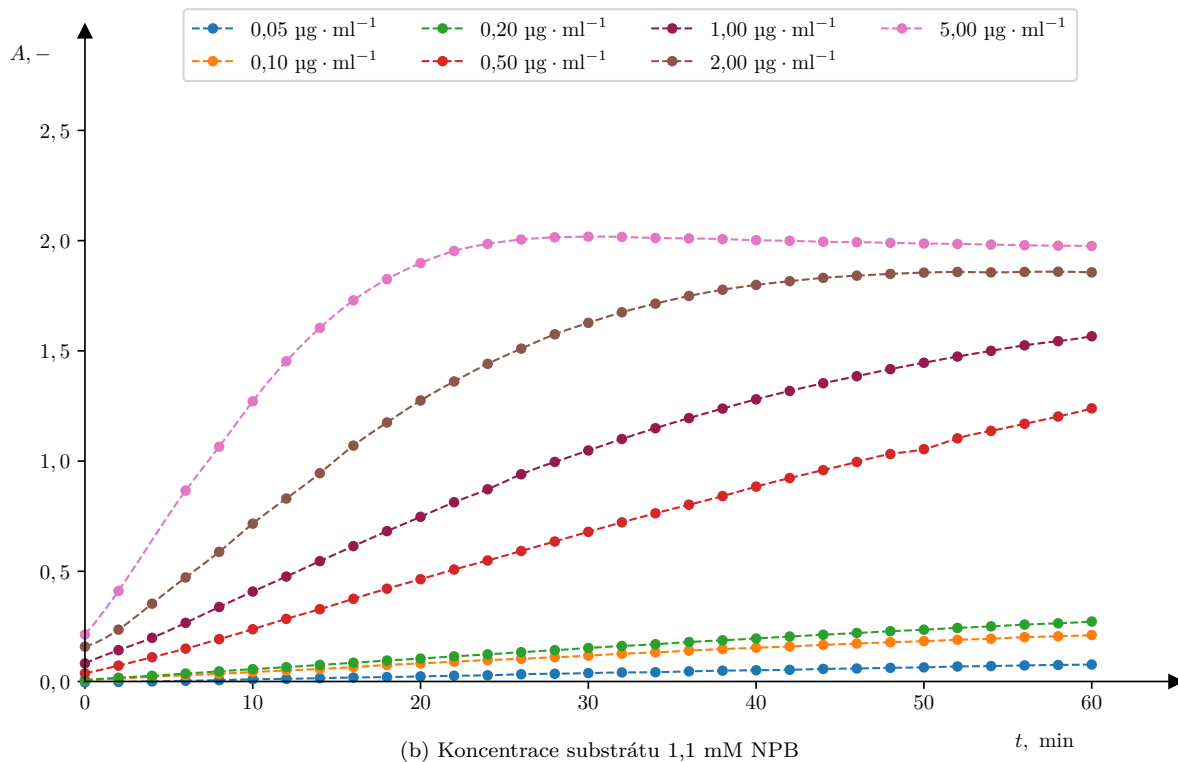
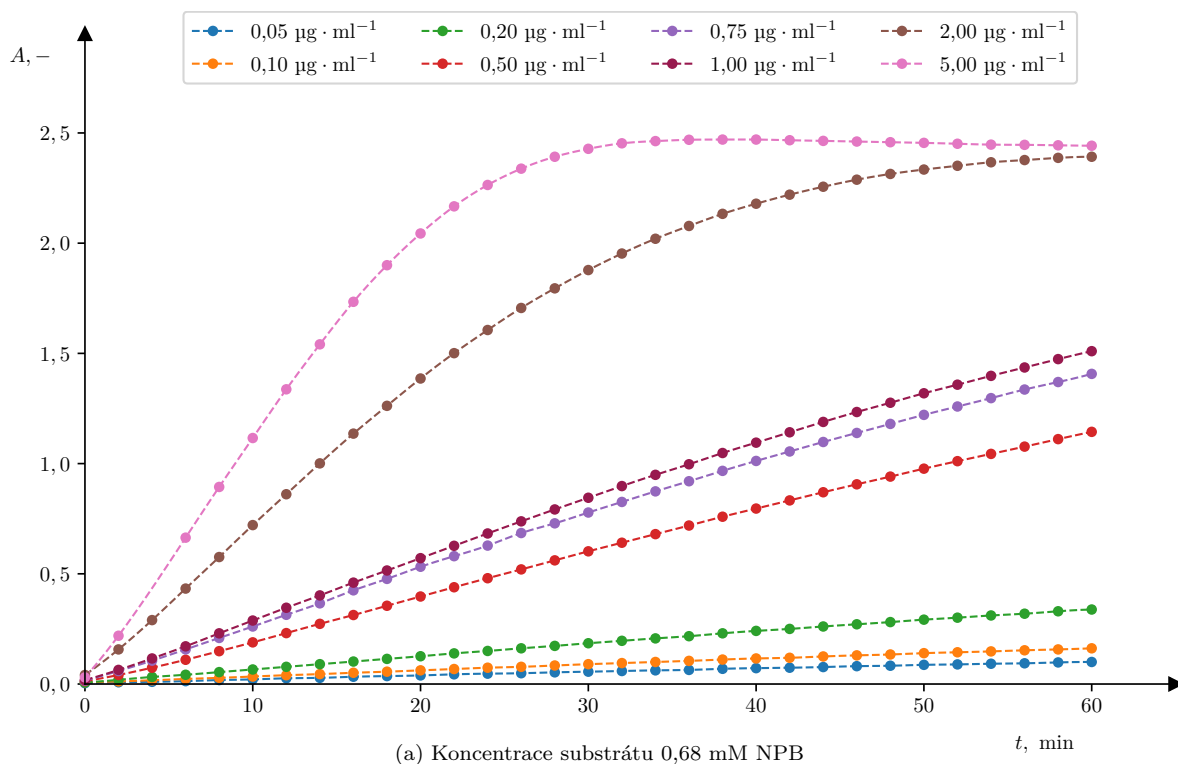
Práce se zabývá studiem aktivity lipázy *Candida rugosa* a jejího využití při epoxidaci rostlinných olejů. Enzym byl zvolen na základě publikací [90–92], které se zabývaly využitím enzymů při epoxidaci alkanů a cykloalkanů a methylesterů mastných kyselin. Záměrem bylo otestovat hydrolytickou aktivitu solubilní lipázy, následně ji imobilizovat na vhodný nosič a aplikovat při přípravě epoxidů methylesterů mastných kyselin.

Hydrolytická aktivita, kterou lipázy jakožto hydrolázy disponují, sloužila k otestování a ověření aktivity solubilní a imobilizované lipázy. Dále také byla využita k určení reakčních podmínek, jako je teplota a pH, které by mohly být vhodné pro epoxidaci, kde není hydrolýza žádoucí. Cílem tedy bylo její potlačení a posunutí katalytického účinku ve směru tvorby epoxidů.

Následně byla provedena reakce imobilizované lipázy s methyloleátem, popř. methylestery řepkového oleje, a peroxidem vodíku jako oxidovadlem. Také byl testován vliv molárního poměru peroxidu vodíku ke dvojným vazbám nenasycených mastných kyselin a pH reakční směsi na výsledek epoxidace. K potvrzení epoxidace byla provedena infračervená spektrometrie, která sloužila k identifikaci absorpčních pásů. Zejména byla sledována změna intenzity absorpčního pásu dvojně vazby, která je předmětem epoxidace.

3.1 Měření hydrolytické aktivity solubilní lipázy

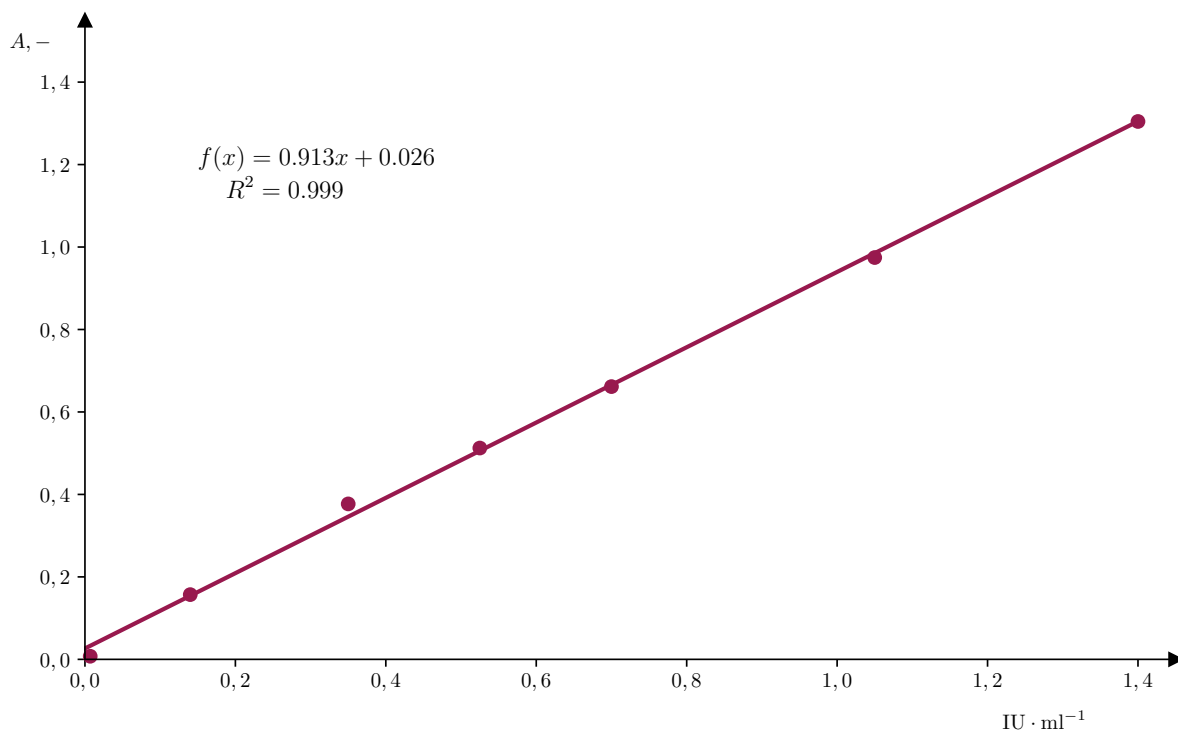
Dříve než byla lipáza imobilizována na částice magnetické makroporézní perlové celulózy a jamky mikrotitrační destičky, bylo nutné stanovit aktivitu solubilního enzymu. K jejímu stanovení byla použita metoda publikovaná Alam a kol v roce 2015 [93] modifikovaná na naše podmínky. Jako substrát sloužil 4–nitrofenylbutyrát (NPB). Stanovení aktivity spočívalo v monitorování absorbance produktu enzymatické reakce, *p*–nitrofenolu, po hydrolýze *p*–NPB. Měření bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 2.3. Absorbance byla měřena při 405 nm, kde vykazuje absorpční maximum vznikající produkt, po celkovou dobu 60 min v intervalech 2 minut. Měření enzymové aktivity lipázy při koncentraci substrátu (NPB) 0,68 a 1,1 mM bylo měřeno kineticky. Koncentrace solubilní lipázy byly zvoleny v rozmezí 0,05–5 µg/ml. Výsledné křivky jsou uvedeny na obrázku 5.



Obrázek 5: **Závislost absorbance na čase pro stanovení aktivity solubilní lipázy.** Koncentrace substrátu: (a) 0,68 mM NPB, (b) 1,1 mM NPB, koncentrace lipázy v rozmezí 0,05–5 µg/ml, v prostředí Tris-HCl (0,1mM, pH 7,4), reakční podmínky: 37 °C, 60 min, $\lambda = 405$ nm.

Pro sestavení kalibrační křivky lipázy byl zvolen čas inkubace 30 min a koncentrace substrátu 0,75 mM NPB. Měření bylo provedeno podle postupu v kapitole 2.3 v dubletu pro koncentrace lipázy v rozmezí 0,1–1,4 IU/ml (0,01–2 µg/ml). Z naměřených hodnot

absorbance byly spočítány průměrné hodnoty, které byly následně vyneseny do grafu závislosti absorbance na koncentraci lipázy (obr. 6). Tato závislost sloužila k výpočtu aktivity imobilizované lipázy.

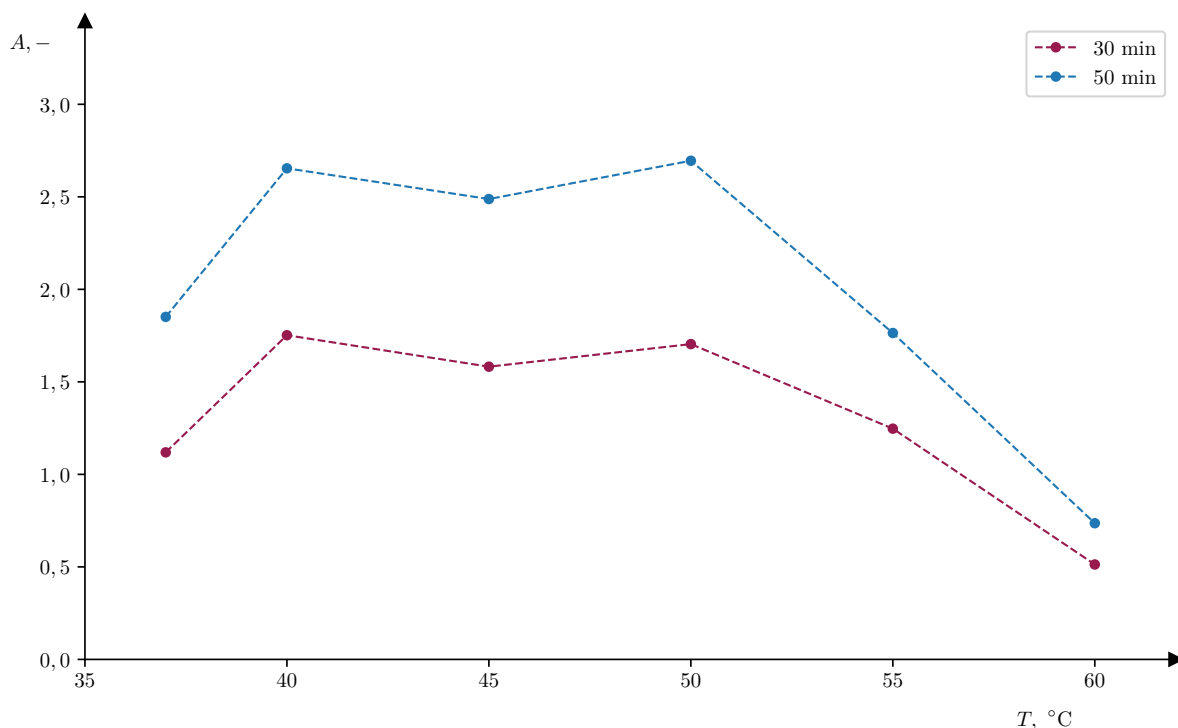


Obrázek 6: Kalibrační křivka solubilní lipázy *C. rugosa*. Závislost absorbance na koncentraci lipázy. Měřeno v Tris–HCl (0,1mM, pH 7,4), substrát 0,75 mM NPB, reakční podmínky: 37 °C, 30 min, $\lambda = 405$ nm. Průměrné hodnoty absorbance ze dvou měření.

3.1.1 Závislost aktivity lipázy na teplotě

Stanovení teplotního optima aktivity solubilní lipázy bylo měřeno jako závislost absorbance na teplotě. Následně byla tato závislost aplikována při epoxidaci methylesterů MK, pro kterou byla zvolena teplota 40 °C.

Měření bylo provedeno pro koncentraci lipázy 0,2 $\mu\text{g/ml}$ a 0,75 mM NPB podle postupu v kapitole 2.3 na UV/Vis spektrofotometru Libra S22 s Peltierovým článkem. Aktivita byla sledována při teplotách 37, 40, 45, 50, 55 a 60 °C. Do grafu závislosti absorbance na teplotě (obr. 7) byly vyneseny hodnoty v čase 30 a 50 min. Z obrázku 7 je patrné, že optimální teplotou pro hydrolytickou reakci je rozmezí 40 až 50 °C. Při teplotách překračujících 50 °C byl pozorován klesající trend aktivity, který byl pravděpodobně způsoben degradací enzymu. Měření bylo provedeno pouze jednou, lze tedy usoudit, že je pravděpodobně zatíženo experimentální chybou měření.

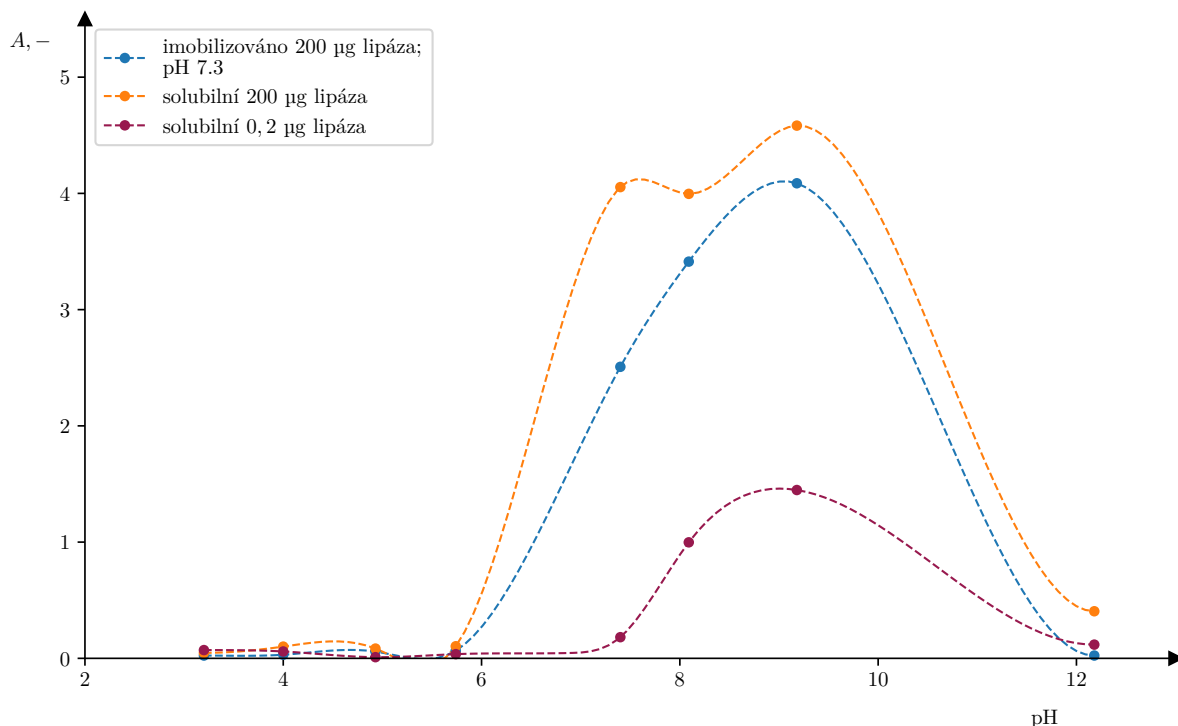


Obrázek 7: **Teplotní optimum hydrolytické aktivity solubilní lipázy.** Závislost absorbance na teplotě. Reakční směs: 0,2 µg/ml lipázy, 0,75 mM NPB; v prostředí Tris–HCl (0,1mM, pH 7,4); reakční podmínky: 37, 40, 45, 50, 55 a 60 °C, 60 min, $\lambda = 405$ nm.

3.1.2 Závislost hydrolytické aktivity lipázy na pH

Závislost hydrolytické aktivity solubilní a imobilizované lipázy na pH sloužila k porovnání, zda nedošlo imobilizací k posunu pH. Také byla důležitým faktorem samotné epoxidace, jelikož lipázy disponují primárně hydrolytickou aktivitou, která není při epoxidaci žádoucí. Cílem bylo potlačení této aktivity a překlenutí účinku ve směru tvorby oxiranu.

Měření pH optima aktivity lipázy bylo provedeno v jamkách mikrotitrační destičky podle postupu uvedeného v kapitole 2.3 na spektrofotometru PowerWave™ HT při teplotě 40 °C, jelikož tato teplota byla zvolena pro epoxidaci. Pro stanovení bylo upraveno pH reakčního pufru Tris–HCl, aby pokrývalo rozmezí pH 3–12. Závislost byla proměřena pro 200 a 0,2 µg solubilní lipázy a 200 µg imobilizované lipázy, která byla imobilizována na jamky mikrotitrační destičky podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.2. Vyhodnocení je znázorněno na obrázku 8, který popisuje závislost absorbance na pH v čase 30 min. Solubilní lipáza o koncentraci 200 µg vykazovala dvě pH maxima, a to při pH 7,4 a 9,18. Podobný trend, avšak ne tak jednoznačný, byl také pozorován u imobilizované lipázy (200 µg). Naopak se nevyskytoval u nižší koncentrace solubilní lipázy, která vykazuje maximální aktivitu pouze při pH 9,18. Lze tedy usuzovat, že závislost aktivity na pH byla u vyšších koncentrací enzymu ovlivněna poměrem enzym:substrát.



Obrázek 8: **Závislost hydrolytické aktivity lipázy na pH v čase 30 min.** Reakční směs: 200 µg imobilizované lipázy, 200 a 0,2 µg solubilní lipázy, v prostředí 0,1mM Tris–HCl v rozmezí pH 3–12, reakční podmínky: teplota 40 °C, $\lambda = 405$ nm.

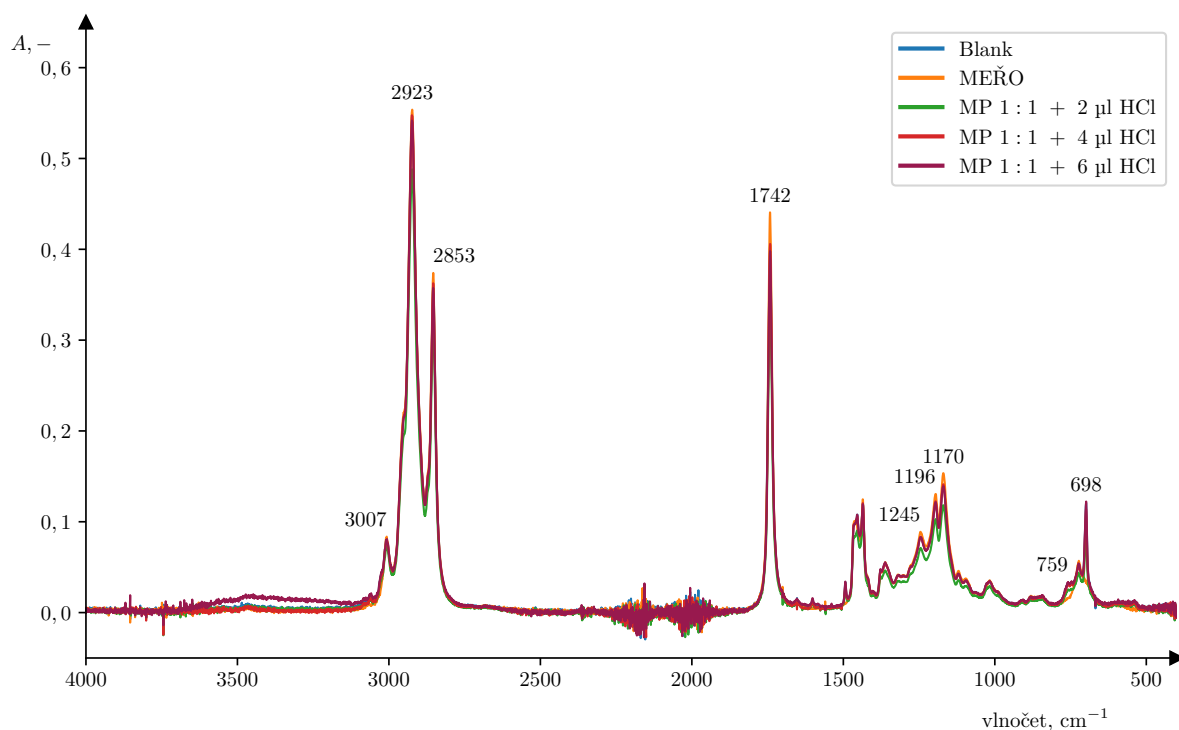
3.2 Výsledek enzymatické epoxidace

Pro identifikaci funkčních skupin ve vzorcích po reakci methylesterů mastných kyselin s peroxidem vodíku v přítomnosti lipázy (provedené podle postupu v kapitole 2.4) byla použita infračervená spektrometrie (IČ). Záznamy IČ spekter z různých sérií měření byly téměř identické, proto byl pro popis zvolen pouze jeden záznam (obr. 9). Který popisuje závislost absorpance na vlnótu, resp. převrácené hodnotě vlnové délky.

V oblasti charakteristických frekvencí ($3300\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$) byly identifikovány absorpční pásy: (i) valenční vibrace alkenů, resp. dvojně vazby, s maximem v 3007 cm^{-1} , (ii) OH skupiny ($3700\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$), (iii) C–H skupiny alkanů a alkenů s maximy 2923 a 2853 cm^{-1} . Odezva diamantového ATR modulu se nacházela v absorpčním pásu $2380\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$.

Obrázek 9 znázorňuje IČ spektra MEŘO, odebraných vzorků po epoxidaci, která probíhala v reakční směsi s obsahem 200 µg lipázy, přídatkem 2, 4 a 6 µl 0,1M HCl a H_2O_2 v molárním poměru 1:1 ke dvojným vazbám. Dvojná vazba nevykazovala pokles intenzity signálu, lze usuzovat, že nedošlo k její požadované epoxidaci. V některých sériích byl pozorován pás valenčních vibrací OH skupiny, který identifikoval vznik alkoholů. V tomto měření se však nevyskytoval. Ve srovnání s MEŘO, vykazovaly

měřené vzorky mírný pokles intenzity absorpce v oblasti valenčních vibrací C–H skupiny alkanů a alkenů. Který byl pravděpodobně způsoben navázáním kyslíku do blízkosti CH₂ skupin alkanového řetězce.



Obrázek 9: IČ spektrum methylesterů řepkového oleje (MEŘO) a vzorků odebraných po epoxidaci. Reakční směs: MEŘO, 200 µg lipázy, přídavek 2,4 a 6 µl 0,1M HCl, H₂O₂ v molárním poměru (MP) 1:1 ke dvojným vazbám. Blank: upravená jamka 2,5% glutaraldehydem, MEŘO, H₂O₂ v MP 1:1 ke dvojným vazbám, přídavek 6 µl 0,1M HCl.

V oblasti tzv. otisku palce (1500–400 cm⁻¹), jedinečné pro každé chemické individuum, byly identifikovány absorpční pásy valenční vibrace karbonylové skupiny ME s maximem 1742 cm⁻¹ a C–O od esterové funkční skupiny s maximy 1245, 1196 a 1170 cm⁻¹. Valenční vibrace oxiranového kruhu dle teorie vykazují absorpční pásy v oblasti 824–845 cm⁻¹.

Na obrázku 9 je v oblasti „otisku palce“ patrný pokles intenzity absorpce valenčních vibrací karbonylové skupiny methylesteru, což mohlo být způsobeno hydrolytickou aktivitou enzymu. Nicméně, podobný trend vykazovalo také IČ spektrum blanku. Pravděpodobně tento pokles souvisí s nárůstem intenzity absorpce v oblasti 759 a 698 cm⁻¹, ale přesná příčina nebyla zjištěna. V průběhu reakce se nezměnila odezva valenčních vibrací C–O od esterové funkční skupiny, jelikož se reakce nezúčastnila. V žádném z měření nebyl pozorován pás náležící oxiranovému kruhu, což nasvědčuje tomu, že epoxidace methylesterů mastných kyselin nebyla úspěšná. Ke stejnému výsledku, avšak se solubilní lipázou *Candida rugosa*, dospěli i Vanags et al. 2023 [83].

4 Závěr

Bakalářská práce se zabývá možnostmi využití enzymů v oleochemii, zejména epoxidací a transesterifikací rostlinných olejů a methylesterů mastných kyselin. Zahrnuje ověření vlivu vybraných reakčních podmínek na přípravu epoxidů pomocí enzymatické katalýzy a jejich srovnání v rámci vybraných publikací.

Cílem bylo popsat využití enzymatické katalýzy pro přípravu epoxidů rostlinných olejů, resp. epoxidů methylesterů mastných kyselin. V experimentální části byla otestována hydrolytická aktivita solubilního enzymu a ověřena aktivita imobilizovaného enzymu lipázy *Candida rugosa*. Taktéž zahrnuje ověření vlivu teploty a pH prostředí na hydrolytickou aktivitu enzymu, které byly následně aplikovány při epoxidaci. Vyhodnocení jednotlivých reakcí methyloleátu, popř. methylesterů řepkového oleje, s peroxidem vodíku v přítomnosti imobilizované lipázy bylo provedeno pomocí infračervené spektrometrie.

Ze získaných infračervených spekter bylo patrné, že dvojná vazba nebyla reakcí ovlivněna, tedy imobilizovaná lipáza *Candida rugosa* za použitých experimentálních podmínek nekatalyzovala epoxidaci. Nicméně, nebylo testováno širší spektrum experimentálních podmínek, nelze tak tvrdit, že touto schopností nedisponuje.

Téma enzymatické epoxidace rostlinných olejů je momentálně velice atraktivní. Avšak využití imobilizované lipázy *Candida rugosa* k tomuto účelu zatím nebylo předmětem rozsáhlejšího výzkumu. Na výsledky této studie bude navázáno v budoucím výzkumu a nadcházející diplomové práci.

Bibliografie

1. NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principles of Biochemistry*. 8th ed.. New York: Freeman & Company, W. H., 2021. ISBN 9781319322342.
2. STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO Gregory J., J. *Biochemistry*. Freeman & Company, W. H., 2019. ISBN 9781319234362.
3. METZLER, D. E. *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells, Second Edition*. Sv. 1-2. 2nd. Academic Press, [b.r.]. ISBN 9780124925434.
4. HOLDE, K. E. van; MATHEWS, C. K.; APPLING, D. R.; ANTHONY-CAHILL, S. J. *Biochemistry*. 4th. Prentice Hall, 2012. ISBN 9780138004644.
5. VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level: Life at the Molecular Level*. Wiley, 2013. ISBN 9781118129180.
6. BONNER, P.; PALMER, T. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. Horwood Publishing Ltd, 2007. ISBN 9781904275275.
7. ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. 2015, **59**, 1–41.
8. DEVLIN, T. M. *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 7th. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9780470601525.
9. KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W. Enzymes: Mechanism of Action. In: *Harper's Illustrated Biochemistry, 31e*. Ed. RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2018.
10. PUNEKAR, N. S. *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer-Verlag GmbH, 2018. ISBN 9789811307850.
11. LIEBERMAN, M.; ALISA PEET, M. D. *Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach: A Clinical Approach*. LWW, 2018. ISBN 9781496324818.
12. PURICH, D. L. *Enzyme kinetics catalysis & control : a reference of theory and best-practice methods*. Elsevier Academic, 2010. ISBN 9780123809247.
13. DEVLIN, T. M. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. John Wiley & Sons, 1997. ISBN 9780471154518.

14. BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley & Sons, Limited, John, 2012. ISBN 9783527632923.
15. CAO, L. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. Wiley-VCH, 2005. ISBN 9783527312320.
16. KOOLMAN, J.; ROHM, K.-H. *Color Atlas Of Biochemistry*. 2nd. Thieme Medical Publishers, 2005. ISBN 9781588902474.
17. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; JR., G. J. G.; STRYER, L. *Biochemistry*. 8th ed.. New York: W. H. Freeman, 2015. ISBN 9781464126109.
18. RODWELL, V. W. Enzymes: Kinetics. In: *Harper's Illustrated Biochemistry, 31e*. Ed. RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2018.
19. MCDONALD, A. *ExplorEnz - the Enzyme database* [webová stránka]. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry a Molecular Biology (NC-IUBMB). Dostupné také z: <https://www.enzyme-database.org/rules.php>. [cit. 2023-04-08].
20. FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, **103**, 7399–7423.
21. KONWAR, B. K.; SAGAR, K. *Lipase: an industrial enzyme through metagenomics: An Industrial Enzyme Through Metagenomics*. Taylor & Francis Group, 2018. ISBN 9781771886185.
22. ABREU CORRÊA, F. de; SUTILI, F. K.; MIRANDA, L. S.; LEITE, S. G.; DE SOUZA, R. O.; LEAL, I. C. Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2012, **81**, 7–11.
23. SALMI, T.; AGUILERA, A. F.; LINDROOS, P.; KANERVA, L. Mathematical modelling of oleic acid epoxidation via a chemo-enzymatic route—From reaction mechanisms to reactor model. *Chemical Engineering Science*. 2022, **247**, 117047.
24. REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Current opinion in chemical biology*. 2002, **6**(2), 145–150.
25. BUGG, T. *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. 2nd. Blackwell Publishing Limited, 2004. ISBN 9781405114523.

26. AEHLE, W. *Enzymes in industry: production and applications*. 3rd. Wiley-VCH, 2007. ISBN 9783527316892.
27. LEISOLA, M. S. A.; JOKELA, J. K.; PASTINEN, O. A.; TURUNEN, O.; SCHOLMAKER, H. E. Physiology and Maintenance. In: ed. HANNINEN, O. O. P.; ATALAY, M. *Encyclopedia of Life Support Systems*, 2009, sv. 2, kap. INDUSTRIAL USE OF ENZYMES. ISBN 978-1-84826-490-8.
28. KOTZIA, G. A.; PLATIS, D.; AXARLI, I. A.; CHRONOPOULOU, E. G.; KARAMITROS, C.; LABROU, N. E. Biocatalysis, Enzyme Engineering and Biotechnology. In: *Food Biochemistry and Food Processing*. John Wiley & Sons, Ltd, 2012, kap. 7, s. 125–166. ISBN 9781118308035.
29. BISSWANGER, H. *Enzyme Kinetics Principles and Methods: Principles and Methods*. Wiley & Sons, Incorporated, John, 2017. ISBN 9783527806478.
30. CHAKRAVORTY, D.; PATRA, S. Advance Techniques in Enzyme Research. In: *Advances in Enzyme Biotechnology*. Ed. SHUKLA, P.; PLETSCHKE, B. I. New Delhi: Springer India, 2013, s. 89–109. ISBN 978-81-322-1094-8.
31. BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*. Ed. GUIBAN, J. M. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, s. 15–31. ISBN 978-1-62703-550-7.
32. CARVALHO, F.; FERNANDES, P. Recent developments in enzyme immobilization for food production. In: KUDDUS, M.; AGUILAR, C. N. (ed.). *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*. Elsevier, 2022, s. 453–466. ISBN 9780323899291.
33. ARABACI, N.; KARAYTUG, T.; DEMIRBAS, A.; OCSOY, I.; KATI, A. Nanomaterials for Enzyme Immobilization. In: 2020, s. 165–190. ISBN 9781119576785.
34. KOTZIA, G.; PLATIS, D.; AXARLI, I.; CHRONOPOULOU, E.; KARAMITROS, C.; LABROU, N. Biocatalysis, enzyme engineering and biotechnology. *Food Biochemistry and Food Processing*. 2012, 125–166.
35. SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chemical Reviews*. 2018, **118**(2), 801–838. PMID: 28876904.
36. CHANCHAROONPONG, C.; HSIEH, P.-C. Effect of black bean koji enzyme on fermentation, chemical properties and biogenic amine formation of fermented fish sauce. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2022, **31**(3), 259–270.

37. GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*. 2013, **2013**.
38. CHAUDHARY, S.; SAGAR, S.; KUMAR, M.; SENGAR, R.; TOMAR, A. The use of enzymes in food processing: A review. *South Asian J Food Technol Environ*. 2015, **1(3&4)**, 190–210.
39. SELAMOGLU, Z. et al. Use of enzymes in dairy industry: a review of current progress. *Archives of Razi Institute*. 2020, **75(1)**, 131.
40. GOMAA, A. Application of Enzymes in Brewing. *J. Nutr. Food Sci. Forecast*. 2018, **1(5)**.
41. PRAKASH, N.; GUPTA, S.; ANSARI, M.; KHAN, Z. A.; SUNEETHA, V. Production of economically important products by the use of pullulanase enzyme. *Int J Sci Innovat Discover*. 2012, **2**, 266–273.
42. ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*. 2014, **4(1)**, 117–139.
43. FEUN, L.; SAVARAJ, N. Pegylated arginine deiminase: a novel anticancer enzyme agent. *Expert opinion on investigational drugs*. 2006, **15(7)**, 815–822.
44. MEGHWANSHI, G. K.; KAUR, N.; VERMA, S.; DABI, N. K.; VASHISHTHA, A.; CHARAN, P.; PUROHIT, P.; BHANDARI, H.; BHOJAK, N.; KUMAR, R. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2020, **67(4)**, 586–601.
45. WEI, S.; LIU, K.; JI, X.; WANG, T.; WANG, R. Application of enzyme technology in biopulping and biobleaching. *Cellulose*. 2021, **28**, 10099–10116.
46. FOLAYAN, A. J.; ANAWE, P. A. L.; ALADEJARE, A. E.; AYENI, A. O. Experimental investigation of the effect of fatty acids configuration, chain length, branching and degree of unsaturation on biodiesel fuel properties obtained from lauric oils, high-oleic and high-linoleic vegetable oil biomass. *Energy Reports*. 2019, **5**, 793–806.
47. ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T.; MASJUKI, H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and sustainable energy reviews*. 2012, **16(4)**, 2070–2093.

48. GUNSTONE, F. D. Major Edible Uses of Oils and Fats. In: *Oils and Fats in the Food Industry*. John Wiley & Sons, Ltd, 2008, kap. 8, s. 113–136. ISBN 9781444302424.
49. RABASCO ÁLVAREZ, A. M.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, M. L. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 51 (1-2), 74-96. 2000.
50. KÖCKRITZ, A.; MARTIN, A. Oxidation of unsaturated fatty acid derivatives and vegetable oils. *European journal of lipid science and technology*. 2008, **110**(9), 812–824.
51. CHUA, S.-C.; XU, X.; GUO, Z. Emerging sustainable technology for epoxidation directed toward plant oil-based plasticizers. *Process Biochemistry*. 2012, **47**(10), 1439–1451.
52. BIERMANN, U.; BORNSCHEUER, U. T.; FEUSSNER, I.; MEIER, M. A.; METZGER, J. O. Fatty acids and their derivatives as renewable platform molecules for the chemical industry. *Angewandte Chemie International Edition*. 2021, **60**(37), 20144–20165.
53. SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. *Arabian Journal of Chemistry*. 2012, **5**(2), 135–145.
54. WADUMESTHRIGE, K.; SALLEY, S. O.; NG, K. S. Effects of partial hydrogenation, epoxidation, and hydroxylation on the fuel properties of fatty acid methyl esters. *Fuel Processing Technology*. 2009, **90**(10), 1292–1299.
55. ATABANI, A.; SILITONGA, A.; ONG, H.; MAHLIA, T.; MASJUKI, H.; BADRUDDIN, I. A.; FAYAZ, H. Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and sustainable energy reviews*. 2013, **18**, 211–245.
56. SCHNEIDER, R. d. C. S.; LARA, L. R.; BITENCOURT, T. B.; NASCIMENTO, M. d. G.; NUNES, M. R. Chemo-enzymatic epoxidation of sunflower oil methyl esters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009, **20**, 1473–1477.
57. BHALERAO, M. S.; KULKARNI, V. M.; PATWARDHAN, A. V. Ultrasound-assisted chemoenzymatic epoxidation of soybean oil by using lipase as biocatalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018, **40**, 912–920.

58. WIKSTRÖM, W.; FREITES AGUILERA, A.; TOLVANEN, P.; LASSFOLK, R.; MEDINA, A.; ERÄNEN, K.; SALMI, T. Fatty Acid Epoxidation on Enzymes: Experimental Study and Modeling of Batch and Semibatch Operation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2023.
59. ELGHARBAWY, A. S.; SADIK, W.; SADEK, O. M.; KASABY, M. A. et al. A review on biodiesel feedstocks and production technologies. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2021, **66**(1), 5098–5109.
60. HASENHUETTL, G. L. Fats and fatty oils. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 2000, 1–37.
61. AZELEE, N. I. W.; RAMLI, A. N. M.; MANAS, N. H. A.; SALAMUN, N.; MAN, R. C.; EL ENSHASY, H. Glycerol in food, cosmetics and pharmaceutical industries: basics and new applications. *Int. J. Sci. Technol. Res*. 2019, **8**, 553–558.
62. MOSER, B. R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2009, **45**, 229–266.
63. MANDARI, V.; DEVARAI, S. K. Biodiesel production using homogeneous, heterogeneous, and enzyme catalysts via transesterification and esterification reactions: A critical review. *BioEnergy Research*. 2021, 1–27.
64. KALITA, P.; BASUMATARY, B.; SAIKIA, P.; DAS, B.; BASUMATARY, S. Biodiesel as renewable biofuel produced via enzyme-based catalyzed transesterification. *Energy Nexus*. 2022, 100087.
65. POGAKU, R.; RAMAN, J. K.; RAVIKUMAR, G. Evaluation of activation energy and thermodynamic properties of enzyme-catalysed transesterification reactions. 2011.
66. LU, H.; SUN, S.; BI, Y.; YANG, G.; MA, R.; YANG, H. Enzymatic epoxidation of soybean oil methyl esters in the presence of free fatty acids. *European journal of lipid science and technology*. 2010, **112**(10), 1101–1105.
67. TÖRNVALL, U.; ORELLANA-COCA, C.; HATTI-KAUL, R.; ADLERCREUTZ, D. Stability of immobilized *Candida antarctica* lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids. *Enzyme and microbial technology*. 2007, **40**(3), 447–451.

68. CARVALHO, N. B.; VIDAL, B. T.; BARBOSA, A. S.; PEREIRA, M. M.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. d. S.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. Lipase immobilization on silica xerogel treated with protic ionic liquid and its application in biodiesel production from different oils. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, **19**(7), 1829.
69. NEZHAD, M. K.; AGHAEI, H. Tosylated cloisite as a new heterofunctional carrier for covalent immobilization of lipase and its utilization for production of biodiesel from waste frying oil. *Renewable Energy*. 2021, **164**, 876–888.
70. BINHAYEEDING, N.; KLOMKLAO, S.; PRASERTSAN, P.; SANGKHARAK, K. Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed immobilised lipases on polyhydroxyalkanoate. *Renewable Energy*. 2020, **162**, 1819–1827.
71. IULIANO, M.; SARNO, M.; DE PASQUALE, S.; PONTICORVO, E. *Candida rugosa* lipase for the biodiesel production from renewable sources. *Renewable Energy*. 2020, **162**, 124–133.
72. ZHANG, H.; LIU, T.; ZHU, Y.; HONG, L.; LI, T.; WANG, X.; FU, Y. Lipases immobilized on the modified polyporous magnetic cellulose support as an efficient and recyclable catalyst for biodiesel production from Yellow horn seed oil. *Renewable Energy*. 2020, **145**, 1246–1254.
73. AOUF, C.; DURAND, E.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M.-C.; DUBREUCQ, E.; FULCRAND, H.; VILLENEUVE, P. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chemistry*. 2014, **16**(4), 1740–1754.
74. KIRPLUKS, M.; POMILOVSKIS, R.; VANAGS, E.; ABOLINS, A.; MIERINA, I.; FRIDRIHSONE, A. Influence of different synthesis conditions on the chemoenzymatic epoxidation of tall oil fatty acids. *Process Biochemistry*. 2022, **122**, 38–49.
75. LIU, W.; DUAN, F. Lipase-catalyzed transesterification of epoxidized soybean oil to prepare epoxy methyl esters. *Grasas y Aceites*. 2018, **69**(2), e247–e247.
76. WARWEL, S. et al. Complete and partial epoxidation of plant oils by lipase-catalyzed perhydrolysis. *Industrial Crops and Products*. 1999, **9**(2), 125–132.

77. STEINHAGEN, M.; GRÄBNER, A.; MEYER, J.; HORST, A. E.; DREWS, A.; HOLTSMANN, D.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Bridging the bridge—Stabilization of CalB against H₂O₂ and its application in epoxidation reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2016, **133**, 179–187.
78. SUSTAITA-RODRÍGUEZ, A.; RAMOS-SÁNCHEZ, V. H.; CAMACHO-DÁVILA, A. A.; ZARAGOZA-GALÁN, G.; ESPINOZA-HICKS, J. C.; CHÁVEZ-FLORES, D. Lipase catalyzed epoxidation of fatty acid methyl esters derived from unsaturated vegetable oils in absence of carboxylic acid. *Chemistry Central Journal*. 2018, **12**, 1–7.
79. TIRAN, C.; LECOMTE, J.; DUBREUCQ, E.; VILLENEUVE, P. Chemo-enzymatic epoxidation of fatty compounds—Focus on processes involving a lipase-catalyzed perhydrolysis step. 2008.
80. GONZÁLEZ-BENJUMEA, A.; CARRO, J.; RENAU-MÍNGUEZ, C.; LINDE, D.; FERNÁNDEZ-FUEYO, E.; GUTIÉRREZ, A.; MARTÍNEZ, A. T. Fatty acid epoxidation by *Collariella virescens* peroxygenase and heme-channel variants. *Catalysis Science & Technology*. 2020, **10**(3), 717–725.
81. AGUILERA, A. F.; LINDROOS, P.; RAHKILA, J.; KLIMOV, M. M.; TOLVANEN, P.; SALMI, T. Lipase catalyzed green epoxidation of oleic acid using ultrasound as a process intensification method. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2022, **174**, 108882.
82. ZHANG, X.; BURCHELL, J.; MOSIER, N. S. Enzymatic epoxidation of high oleic soybean oil. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, **6**(7), 8578–8583.
83. VANAGS, E.; ABOLINS, A.; CABULIS, U. Lipase Catalyzed Self-epoxidation of Tall Oil Fatty Acids in Batch and Continuous Flow Conditions. *Journal of Polymers and the Environment*. 2023, **31**(5), 2166–2176.
84. SUN, S.; KE, X.; CUI, L.; YANG, G.; BI, Y.; SONG, F.; XU, X. Enzymatic epoxidation of *Sapindus mukorossi* seed oil by perstearic acid optimized using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2011, **33**(3), 676–682.
85. VLČEK, T.; PETROVIĆ, Z. S. Optimization of the chemoenzymatic epoxidation of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2006, **83**, 247–252.

86. SUSTAITA-RODRÍGUEZ, A.; VEGA-RIOS, A.; BUGARIN, A.; RAMOS-SÁNCHEZ, V. H.; CAMACHO-DÁVILA, A. A.; ROCHA-GUTIÉRREZ, B.; CHÁVEZ-FLORES, D. Chemoenzymatic epoxidation of highly unsaturated fatty acid methyl ester and its application as poly (lactic acid) plasticizer. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, **9**(50), 17016–17024.
87. ORELLANA-COCA, C.; CAMOCHO, S.; ADLERCREUTZ, D.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Chemo-enzymatic epoxidation of linoleic acid: Parameters influencing the reaction. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2005, **107**(12), 864–870.
88. PIAZZA, G. J.; NUÑEZ, A.; FOGLIA, T. A. Epoxidation of fatty acids, fatty methyl esters, and alkenes by immobilized oat seed peroxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003, **21**(3), 143–151.
89. MARRIAM, F.; IRSHAD, A.; UMER, I.; ASGHAR, M. A.; ATIF, M. Vegetable oils as bio-based precursors for epoxies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2023, **31**, 100935.
90. MIURA, Y.; YAMANE, T. Epoxidation of alkanes and cycloalkanes by microbial lipases immobilized with photo-crosslinkable resin prepolymer. *Biotechnology letters*. 1997, **19**, 611–613.
91. BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, S. E.; KIRK, O. Lipase-mediated formation of peroxycarboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1990, (19), 1301–1303.
92. POSORSKE, L. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1984, **61**(11), 1758–1760.
93. ALAM, P.; RABBANI, G.; BADR, G.; BADR, B. M.; KHAN, R. H. The surfactant-induced conformational and activity alterations in *Rhizopus niveus* lipase. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015, **71**, 1199–1206.