

NEVENA D. OGNJANOVIĆ
SLOBODAN D. PETROVIĆ
DEJAN I. BEZBRADICA
ZORICA D.
KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ

Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Beograd

PREGLEDNI RAD

UDK 66:544.473:577.15

DOI: 10.2298/HEMIND10010010

LIPAZE KAO BIOKATALIZATORI U SINTEZI BIODIZELA

Lipaze predstavljaju jednu od najvažnijih grupa biokatalizatora koji imaju veliku primenu u biotehničkim procesima. Zahvaljujući činjenici da mogu katalizovati i hidrolizu i esterifikovanje, često se koriste u reakcijama transesterifikacije. Zbog niza prednosti koje imaju nad klasičnim katalizatorima lipaze postaju sve pogodnije za upotrebu u sintezi biodizela. U ovom radu prikazane su karakteristike lipaza koje se koriste u biotehnologiji, kao i njihova primena u sintezi biodizela.

Biodizel je tečno biogorivo, proizvedeno iz poljoprivrednih kultura, kao obnovljivih resursa, koje u potpunosti može da zameni fosilno gorivo u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem. Sa ekološkog aspekta biodizel gorivo ne zagađuje životnu sredinu, jer se pri sagorevanju ovog goriva prizvodi onoliko ugljen-dioksida koliko biljke, iz kojih je dobijen, vezuju iz atmosfere. Biodizel ne sadrži sumpor, a pri njegovom sagorevanju smanjena je emisija čađi, benzola, toluola, kao i štetnih azotnih jedinjenja, netoksičan je i biodegradabilan [1,2]. Pored navedenih prednosti, biodizel je obnovljivi izvor energije i njegovim korišćenjem smanjuje se potreba za fosilnim dizelom, čime se čuvaju rezerve i umanjuje rizik od snabdevanja. Najzastupljeniji postupak za dobijanje biodizela u industriji je hemijska transesterifikacija biljnih ulja metanolom u prisustvu alkalnog katalizatora (natrijum-metilata, NaOH, ili KOH) ili kiselog katalizatora (koncentrovana sumporna kiselina) [3–6]. Ovakav način proizvodnje ima nekoliko nedostataka kao što su veliki energetska utrošci, stvaranje nusprodukata sporednim reakcijama, potreba za neutralizacijom katalizatora i izdvajanje nastalog glicerola iz reakcione smeše [7–9]. Tokom reakcije metanolize stvaraju se sapuni koji se moraju ispirati vodom i čije prisustvo otežava separaciju proizvoda. Utvrđeno je da se pažljivom optimizacijom procesnih parametara može značajno unaprediti hemijski proces transesterifikacije i dobiti biodizel boljeg kvaliteta [8,10]. Neki od najvažnijih faktora koji utiču na prinos estara u slučaju reakcije katalizovane kiselinama ili bazama su vrsta katalizatora, molski odnos alkohola i ulja, temperatura, početni sadržaj vode u sistemu, uslovi mešanja i drugi [11,12].

Nedostaci konvencionalnog homogeno-katalizovanog postupka mogu se prevazići na nekoliko načina kao što su primena heterogenih katalizatora (hidroksidi i oksidi zemno-alkalnih metala) [13–15], odvijanje reakcije transesterifikacije pod uslovima natkritičnog fluida [16,17] i korišćenjem enzima (lipaza) kao bio-katalizatora [18,19].

Enzimski postupak dobijanja biodizela je jednostavniji i ekonomičniji od homogeno-katalizovanog procesa [20,21]. Osnovne prednosti enzimskih u odnosu na hemijske postupke su blagi reakcioni uslovi (temperature od 30 do 60 °C), izdvajanje glicerola bez dodatnog prečišćavanja i bez stvaranja hemijskog otpada kao i mogućnosti lipaza da esterifikuju slobodne masne kiseline prisutne u uljima tako da su zahtevi za čistoćom polaznih sirovina znatno blaži. Primenom enzima kao katalizatora u reakciji transesterifikacije ne nastaju sapuni kao sporedni proizvodi, čime se značajno olakšavaju postupci prečišćavanja i time dobija biodizel boljeg kvaliteta. Tako, korišćenjem bio-katalizatora nema potrebe za ispiranjem proizvoda u završnoj fazi sinteze biodizela i njegovog prečišćavanja, pa se smanjuje količina otpadne vode koja predstavlja ozbiljan ekološki problem (slika 1).

Pored očiglednih prednosti, enzimski postupci još uvek nisu konkurentni hemijskim postupcima. Osnovna prepreka za uvođenje enzimskih postupaka proizvodnje je visoka cena enzima, mala aktivnost i stabilnost u prisustvu polarnih alkohola kao što su metanol i etanol. Mada je diskutabilno koji su procesi ekonomičniji, napred navedene prednosti biodizela idu u prilog opredeljenju za enzimski postupak.

LIPAZE

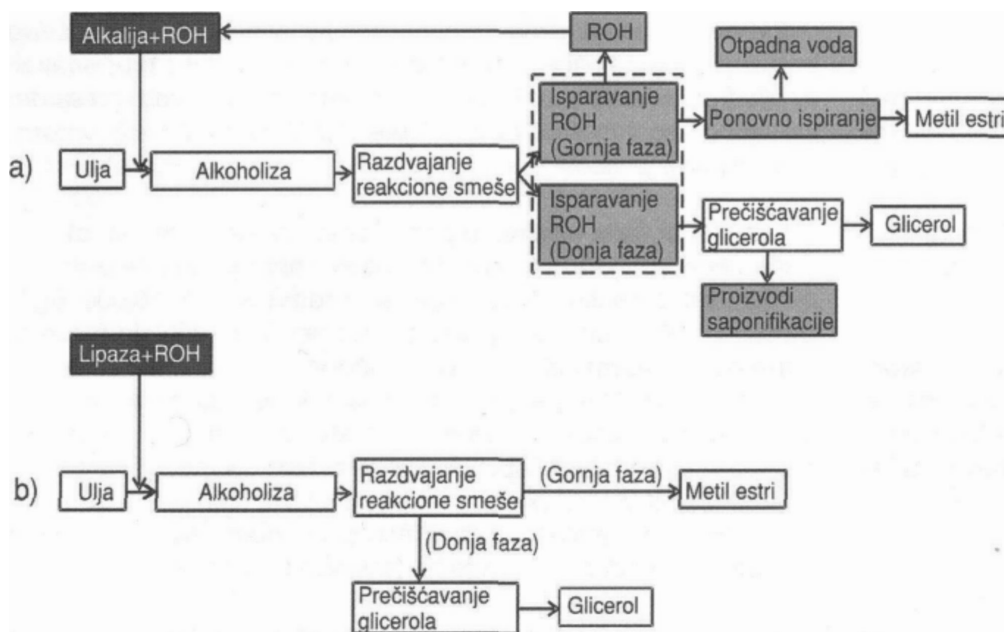
Lipaze (triacilglicerolestar hidrolaze, EC 3.1.1.3) jesu enzimi koji katalizuju hidrolizu karboksilne estarske veze u molekulu triacilglicerola pri čemu nastaju slobodne masne kiseline, di- i monoacilgliceroli i glicerol [22]. Iako je njihova prirodna funkcija katalizovanje hidrolize estarske veze, one mogu i da katalizuju reakciju između hidroksilne grupe alkohola i karboksilne grupe karboksilnih kiselina, odnosno esterifikovanje [23–25]. Zahvaljujući činjenici da mogu katalizovati i hidrolizu i esterifikovanje, vrlo često se koriste u reakcijama transesterifikacije [26,27]. Lipaze imaju važnu ulogu u metabolizmu lipida zbog čega su veoma rasprostranjeni u prirodi. Mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog porekla. Lipaze se u organizmima ljudi i životinja nalaze u pankreasu, želucu i jetri gde učestvuju u hidrolizi triglicerida. Lipaze se nalaze i u bilj-

Autor za prepisku: N. Ognjanović, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, p. pr. 3503, 11120 Beograd.

E-pošta: nevenao@gmail.com

Rad primljen: 1. oktobar 2009.

Rad prihvaćen: 4. decembar 2009.



Slika 1. Poređenje tehnoloških postupaka dobijanja biodizela a) bazno b) enzimski katalizovanom transesterifikacijom.
Figure 1. Comparison of biodiesel production processes a) alkali b) enzymatic catalyzed transesterification.

nom svetu, obično u semenju, plodovima i podzemnim delovima biljaka. Veliki broj mikroorganizama sintetiše lipaze koje su uglavnom ekstracelularni enzimi. Trenutno, najveći biotehnoški značaj imaju lipaze mikrobiološkog porekla, zbog niza prednosti u odnosu na lipaze animalnog i biljnog porekla [28]. Korišćenjem mikrobni lipaza ostvaruju se veći prinosi enzima, moguća je genetička manipulacija proizvodnog mikroorganizma, prinos ne zavisi od potencijalnih sezonskih variranja i moguć je brz rast mikroorganizma na jeftinim hranljivim podlogama [29]. Lipaze koje se dobijaju iz kvasca i plesni kao što su *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosa* i *Rhizomucor miehei* najviše se koriste zbog relativno niske cene i pristupačnosti [1,30].

Specifičnost lipaza

Selektivnost je važna osobina lipaza na kojoj se zasniva njihova praktična primena jer pravilnim izborom lipaze moguće je usmereno odvijanje reakcije i dobijanje čistog proizvoda u velikom prinosu. Lipaze imaju više vrsta specifičnosti i to: specifičnost u odnosu na estar, pozicionu specifičnost, specifičnost u odnosu na masne kiseline i stereohemijsku specifičnost [28].

Specifičnost u odnosu na estar podrazumeva različitu brzinu hidrolize tri-, di-, monoacilglicerola, estara holesterola, metil- i drugih estara. U zavisnosti da li hidrolizuju, samo primarnu ili i sekundarnu vezu u molekulu triacilglicerola, lipaze se dele na poziciono specifične i poziciono nespecifične. Poziciono specifične ili *sn*-1,3 specifične lipaze deluju samo na primarnu estarsku vezu u molekulu triacilglicerola i u tu grupu spadaju

lipaze: *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* i druge. Poziciono nespecifične lipaze hidrolizuju primarnu i sekundarnu vezu u molekulu triacilglicerola približno istom brzinom i u tu grupu spadaju: *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* i druge. Ipak ova podela je prilično uopštena jer se specifičnost lipaza može kretati od stroge specifičnosti, preko vrlo slabe do potpune nespecifičnosti.

Za sintezu estara je od velikog značaja specifičnost lipaza u odnosu na masne kiseline na koje deluje. Smatra se da dužina lanca masne kiseline najviše utiče na brzinu reakcije. Pošto fizičko stanje masti jako utiče na brzinu hidrolize, treba voditi računa o tome da su triacilgliceroli koji se sastoje iz nižih zasićenih ili više nezasićenih masnih kiselina u tečnom stanju, dok su triacilgliceroli viših zasićenih masnih kiselina na uobičajenim temperaturama ispitivanja (30–40 °C) u čvrstom stanju. U zavisnosti od porekla (biljne, životinjske i mikrobne) lipaze pokazuju različitu specifičnost prema masnim kiselinama. Tako pankreasna lipaza znatno brže hidrolizuje masne kiseline sa manjim brojem ugljenikovih atoma, kao i lipaza iz *Mucor miehei*, dok sa druge strane lipaza iz *Rhizopus arrhizus* pokazuje neznatno veći afinitet prema masnim kiselinama sa većim brojem ugljenikovih atoma [31,32].

Optička ili stereohemijska specifičnost se ogleda u tome da enzim deluje samo na jedan od dva moguća stereohemijska oblika supstrata. Ovu vrstu specifičnosti pokazuju lipaze iz *Candida rugosa*, *Pseudomonas aeruginosa* i pankreasna lipaza [33,34]. Na ovoj osobini zasniva se njihova primena za razdvajanje racemskih sme-

ša radi dobijanja fiziološki aktivnih jedinjenja, finih hemikalija i farmaceutika [30].

Struktura i mehanizam delovanja lipaza

Razvojem savremenih fizičko-hemijskih metoda određena je struktura većina lipaza i struktura samog aktivnog centra enzima. Primarna struktura lipaza je određena sekvencionom analizom samog proteina ili odgovarajućeg gena. Broj aminokiselinskih ostataka u molekulu lipaze varira u vrlo širokom opsegu, između 270 i 640 [35]. Razvoj metoda rendgenske kristalografije je omogućio određivanje sekundarne i tercijarne strukture proteina, tako da je tokom prve polovine devedesetih godina prošlog veka došlo do potpunog rasvetljavanja konformacije nekoliko desetina lipaza različitog porekla [34]. Pokazalo se da se aktivni centar enzima nalazi u unutrašnjosti molekula i da je zaklonjen peptidnim lancem. Iz do sada poznatih struktura proizilazi da aktivni centar većine lipaza čine ostaci tri amino kiseline: serina, asparagina ili glutamina, i histidina [28]. Za ostatke histidina su vodoničnim vezama vezani ostaci serina i ostaci karboksilne grupe neke od kiselina glutamina ili asparagina. Takav prostorni raspored omogućava ostacima serina da napadnu karbonilnu grupu molekula supstrata. Položaj u primarnoj strukturi ova tri aminokiselinska ostatka u lipazama različitog porekla drastično se razlikuje, ali zahvaljujući različitim konformacijama oni se nalaze na povoljnom rastojanju za formiranje aktivnog centra [36].

Reakcije katalizovane lipazama se odvijaju u dve etape. U prvoj fazi serin napada karbonilnu grupu supstrata i formira se aciloenzimski kompleks usled čega se oslobađa molekul alkohola. U drugoj fazi, usled napada nukleofilne grupe, dolazi do hidrolize kompleksa. U vodenim rastvorima nukleofilna grupa je hidroksilna grupa

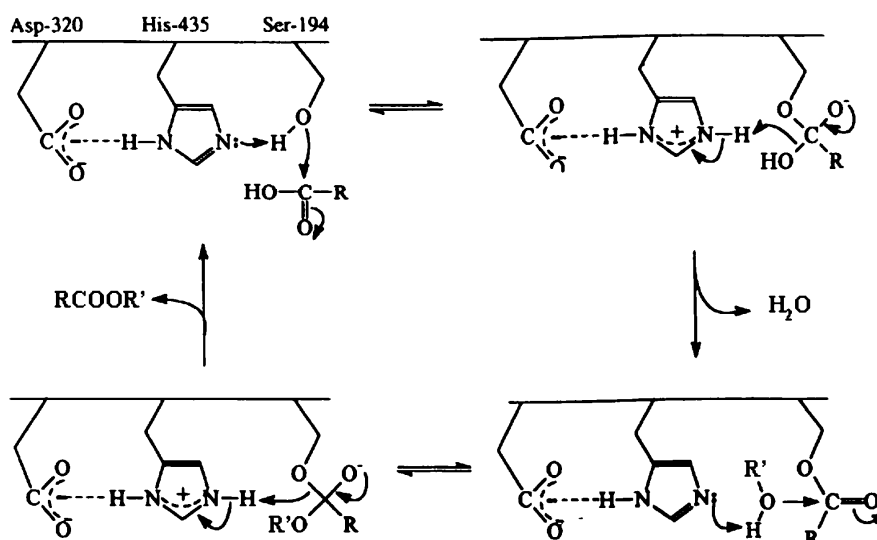
iz molekula vode, pa kao proizvod nastaje masna kiselina.

Reakcioni sistem za delovanje lipaza je dvofazni sistem koji se sastoji iz supstrata nerastvornog u vodi i vode. Lipaze imaju karakterističan mehanizam delovanja jer su aktivne na granici faza ulje-voda. Naime, aktivni centar lipaze se nalazi u unutrašnjosti molekula, zaklonjen peptidnim vezama. Takav položaj onemogućava molekulu supstrata, da se veže za enzim što dovodi do toga da su lipaze uglavnom neaktivne u vodenim rastvorima (slika 2). Međutim, kada se lipaza adsorbuje na graničnoj površini između vodene i nepolarne faze, dolazi do promene prostornog rasporeda molekula zbog pomeranja hidrofobnih delova peptidnog lanca ka nepolarnoj fazi. Molekul lipaze zauzima tzv. „otvorenu konformaciju“ pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulima supstrata i omogućava se stvaranje kompleksa enzim-supstrat (slika 3).

Primena lipaza

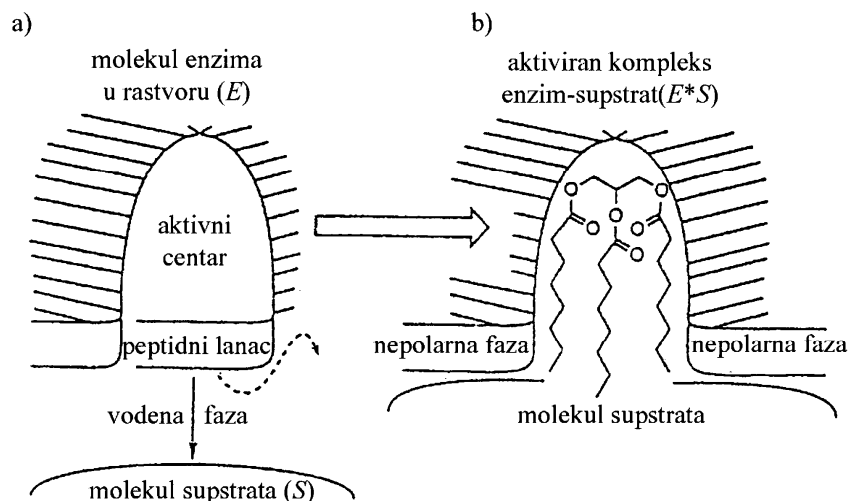
Prednost primene lipaza kao katalizatora u velikom broju reakcija su blagi reakcioni uslovi, usmerenost reakcije, znatno manji utrošak energije i dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta sa većim prinosom uz znatno manje zagađivanje životne sredine. Takođe, proizvodi dobijeni enzimskim putem su čistiji, sa manje primesa, što je veoma važno u kasnijim fazama prečišćavanja posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Proizvodi se smatraju prirodnim i ekološkim ukoliko se u njihovoj proizvodnji dodaju aditivi dobijeni enzimskim putem.

U ukupnoj svetskoj proizvodnji enzima lipaze su na trećem mestu, iza proteaza i enzima koji katalizuju hidrolizu ugljenih hidrata [37]. Upotreba lipaza može da se podeli u dve kategorije: kao katalizator u industrijskoj proizvodnji i kao sastojak proizvoda. Razvijene gra-



Slika 2. Mehanizam reakcije katalizovane lipazama.

Figure 2. Lipase catalyzed synthesis.



Slika 1. Poređenje tehnoloških postupaka dobijanja biodizela a) bazno b) enzimski katalizovanom transesterifikacijom.
Figure 1. Comparison of biodiesel production processes a) alkali b) enzymatic catalyzed transesterification.

ne industrije u kojima lipaze imaju značajnu ulogu su industrija masti i ulja, prehrambena industrija (modifikovanje arome pojedinih namirnica), kožarska industrija (odmašćivanje kože), kozmetička industrija, mlečna industrija (hidroliza mlečne masti) [38,39]. Zahvaljujući stereoselektivnom dejstvu lipaza, i njihovoj mogućnosti da razdvajaju racemske smeše optičkih izomera sve više se upotrebljavaju u farmaceutskoj industriji, industriji pesticida i herbicida [30,32]. Najveći komercijalni značaj lipaze imaju u industriji detergenata, gde predstavljaju sastojak industrijskog proizvoda, a ne katalizator u procesu proizvodnje. One se dodaju u detergente da bi uklonile masne mrlje tako što ih razlažu na hidrofilnija jedinjenja – diacilglicerole, monoglicerole, masne kiseline i glicerol.

Lipaze u proizvodnji biodizela

Veliki broj različitih faktora utiče na enzimski katalizovanu sintezu biodizela: osnovna svojstva ulja i količina upotrebljenog alkohola u sintezi, prisustvo organskog rastvarača, prisustvo vode u reakcionoj smeši, temperatura reakcije, kao i tip i vrsta lipaze.

Za sintezu biodizela se kao polazne sirovine mogu koristiti biljna ulja različitog porekla: suncokretovo ulje [40,41], sojino ulje [42,43], palmino ulje [44], ulje iz uljane repice [45] i Jatropha ulje [46]. S obzirom na to da je cena jestivog ulja veoma visoka teži se korišćenju otpadnog i korišćenog ulja kao polazne sirovine jer na taj način i cena finalnog proizvoda postaje pristupačnija [47–49]. Chen i saradnici su koristeći imobilisanu lipazu, razvili sistem enzimске transesterifikacije korišćenog ulja u reaktoru sa pakovanim slojem. Sintetizovan je biodizel čije su hemijske i fizičke karakteristike superiornije u odnosu na standarde za dizel i biodizel (GB/T 19147, DIN V51606 i ASTM D-6751) [50]. Ulje iz uljane repice (Canola ulja) zbog visokog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina i niskog sadržaja

zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, predstavlja idealnu sirovinu za proizvodnju biodizela [51]. To je najčešća sirovina za proizvodnju biodizela u Evropi [52].

Danas su razvijeni efektivni postupci sinteze biodizela, koristeći slobodno suspendovane ili imobilisane lipaze, u sistemima sa ili bez organskog rastvarača. U dosadašnjim istraživanjima korišćene su intra- i ekstraćelijske lipaze koju proizvode različiti mikroorganizmi kao što su *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* i *Pseudomonas cepacia* [18,53–55]. Istraživanja su pokazala da su imobilisani enzimi aktivniji i stabilniji u odnosu na slobodno suspendovane [56]. Imobilizacija se zasniva na vezivanju enzima na nerastvorni čvrsti nosač. Imobilizacijom enzima se produžava njihov radni vek jer se nakon završene reakcije imobilisani enzimi mogu odvojiti dekantacijom ili filtracijom i ponovo koristiti u sledećem ciklusu. Imobilizacija je omogućila i razvoj kontinualnih sistema sinteze biodizela (reaktori sa pakovanim slojem), a samim tim i snižavanje cene proizvodnog postupka [57]. Metode za imobilizaciju su razne ali se mogu podeliti u tri grupe: metoda adsorpcije na čvrstom nosaču, inkluzija ili enkapsulacija i kovalentna imobilizacija. Izbor metode imobilisanja, kao i materijala, koji će se koristiti kao nosač, zavisi od karakteristika koje su važne u željenom industrijskom postupku [58,59].

U reakciji transesterifikacije se mogu koristiti alkoholi kraćeg (metanol, etanol) i dužeg lanca (propanol, butanol, pentanol) kao i alkoholi razgranatog lanca (2-propanol, isoamil-alkohol) [2,54]. Povećanje broja ugljenika u lancu alkohola povećava cetanski broj, odnosno povećava se toplotna moć proizvedenog biodizela. Estri masnih kiselina razgranatih alkohola mogu se koristiti kao aditivi za goriva pošto snižavaju temperaturu

magljenja i temperaturu tečenja [60,61]. Međutim, iako estri viših alkohola imaju bolja niskotemperaturna svojstva, viša cena i složeniji proces proizvodnje ih čini nekompetitivnim za industrijsku proizvodnju biodizela. Najčešće korišćen alkohol za transesterifikaciju je metanol [54]. Prednost metanola u odnosu na više alkohole je pre svega niska cena kao i mogućnost dobijanja metanola u bezvodnom obliku čime se sprečava uvođenje vode u proces. Takođe, stvoreni metil estri masnih kiselina (MEMK) imaju povoljnija svojstva u pogledu nemešljivosti sa glicerolom čime se olakšava prečišćavanje finalnog proizvoda.

Temperatura je veoma bitan faktor u enzimski katalizovanim reakcijama. Temperaturni optimum, pre svega, zavisi od vrste lipaze. Tako je optimalna temperatura u reakciji metanolize suncokretovog ulja lipazom iz *T. lanuginosa* 50 °C, a lipazom iz *R. miehei* 40 °C [62]. U principu, na početku enzimski reakcija se sa povišenjem temperature ubrzava. Zatim se dostiže maksimum dejstva enzima, a pri daljem povišenju temperature, njegova katalitička moć se naglo smanjuje zbog denaturacije enzima toplotom. Istraživanja su pokazala da se imobilizacijom povećava otpornost enzima na temperaturne promene [63]. Temperaturni optimum imobilisanih lipaza mogu biti pomereni ka višim temperaturama u odnosu na temperaturne optimume slobodnih enzima.

Jedan od ključnih faktora za sintezu estara je i sadržaj vode u sistemu [64]. Određena mala koncentracija vode u reakcionom sistemu je neophodna zbog održavanja trodimenzionalne strukture enzima. Sa druge strane, povećana koncentracija vode u sistemu pomera ravnotežu povratne reakcije u pravcu reakcije hidrolize. Ukoliko je sadržaj vode u sistemu veći od optimalnog za datu reakciju, brzina transesterifikacije će biti mnogo manja od povratne reakcije hidrolize estara [65]. Očigledno je da treba voditi računa o sadržaju vode u sistemu i eksperimentalno odrediti optimalnu koncentraciju u svakom pojedinačnom slučaju. Mnoga istraživanja su pokazala da je enzimsko dobijanje biodizela pomoću imobilisanih lipaza moguće i bez prisustva vode. Tako imobilisana lipaza iz *C. antarctica* (CAL-B) zahteva manju hidrataciju. Tamalampudi i saradnici su koristeći istu lipazu zaključili da sa porastom količine vode u sistemu opada prinos biodizela, a da bi najveći prinos od 75% bio ostvaren u sistemu bez dodate vode [66].

Prvu enzimsku reakciju s ciljem dobijanja biodizela izveo je Nelson [67]. U reakciji je upotrebio imobilisanu lipazu iz *Rizomuchor miehei*, u prisustvu organskog rastvarača *n*-heksana. Postignuta je 95% konverzija ulja u metil (etil) estre. Step en konverzije triglicerida zavisi i od tipa organskog rastvarača koji je prisutan u toku enzimski reakcije. Imobilisane lipaze pokazale su visok stepen efikasnosti u prisustvu nepolarnih rastvarača [62]. Polarni rastvarači nisu pogodni za biokata-

litike procese pošto polarni molekul rastvarača narušava mikrovodeni sloj enzima i na taj način utiče na nativnu strukturu enzima, dovodeći do denaturacije. Nie i saradnici su pokazali da se najbolji prinosi, kada je korišćena lipaza iz *Candida antarctica* imobilisana na akrilnoj smoli, ostvaruju kada se kao rastvarač koristi *n*-heksan, dok su najmanji prinosi ostvareni u sistemu sa polarnim rastvaračima, kao što je aceton [68]. Visoki prinosi su ostvareni i u reakciji transesterifikacije sa imobilisanim lipazom iz *Pseudomonas fluorescens*, pri čemu se kao rastvarač koristio 1,4-dioksan [69]. Li i saradnici su kao rastvarač koristili *tert*-butanol u reakciji transesterifikacije ulja iz uljane repice. Koristeći Lipozyme TI LM (lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* imobilisan na silika gelu) i Novozyme 435 (lipaza iz *Candida antarctica* imobilisana na akrilnoj smoli) kao katalizatore pod optimalnim uslovima reakcije su ostvarili prinos od 95% [70]. *Tert*-butanol je kao rastvarač korišćen u enzimskoj produkciji biodizela iz pamučnog ulja sa lipazom iz *C. antarctica* i to u šaržnom i reaktoru sa pakovanim slojem [71]. U oba slučaja ostvaren je prinos od preko 90%.

Sa ekonomske tačke gledišta, upotreba organskih rastvarača je nepovoljna zbog neophodnosti njihovog uklanjanja iz finalnog proizvoda čime se dodatno povećavaju troškovi proizvodnje. Najveći problem implementiranja lipaza u sintezi biodizela u sistemu bez organskog rastvarača je relativno slaba aktivnost enzima u prisustvu viška alkohola. Da bi se smanjila difuziona ograničenja i povećala brzina reakcije potrebno je dodati alkohol u višku u odnosu na stehiometrijski potrebnu količinu (3:1) [72]. Pokazano je u literaturi da se veliki broj lipaza inaktivira pri koncentracijama metanola koje su veće za 33–50% od stehiometrijski potrebne količine za reakciju transesterifikacije [67,71,73]. Da bi se ostvarili što bolji prinosi biodizela, potrebno je znati optimalni odnos metanol/ulje za različite vrste lipaza jer pri većem molarnom odnosu od optimalnog dolazi do smanjenja prinosa biodizela. Naime, u tipičnoj reakciji metanolize, usled slabe rastvorljivosti metanola u ulju, reakciona smeša se sastoji od dve faze. U kontaktu lipaza sa nerastvornim kapljicama alkohola, koji postoje u ulju, alkohol se adsorbuje na imobilisan enzim, blokira pristup triglicerida, zbog čega se smanjuje aktivnost enzima, dolazi do njegove inaktivacije i smanjenja prinosa MEMK. Da bi se minimizirala inaktivacija enzima, u sistemu bez organskog rastvarača, razvijen je postupak postepenog dodavanja metanola u toku reakcije u skladu sa dinamikom njegove potrošnje tako da se održava njegova koncentracija na određenom nivou pri kojoj je smanjena inhibicija enzima. Ispitivanja su pokazala da je trostepenim dodavanjem metanola u reakciji sa lipazom iz *C. antarctica* nakon 48 sati ostvaren prinos od 98% [74]. I druga istraživanja su pokazala da je višestepeni sistem dodavanja metanola supe-

riorniji u odnosu na jednostepeni [20,75]. Grupa istraživača je izvela metanolizu biljnih ulja imobilisanom lipazom iz *C. antarctica* u šaržnim uslovima sa dvostepenim [76] i trostepenim [77] dodavanjem metanola (odnosno po 505 ili 33% od stehiometrijski potrebne količine), pri čemu je ostvaren prinos od 95%, odnosno 98.4%.

Drugi pristup poboljšavanja performansi lipaza u sistemu bez organskog rastvarača, kada se kao reaktanti koriste izrazito polarna jedinjenja (metanol), jeste regeneracija biokatalizatora ispiranjem sa C3-C5 alkoholima. Lipaza iz *C. antarctica*, dekativirana viškom metanola u reakciji transesterifikacije, je povratila 56%, odnosno 75% svoje prvobitne aktivnosti nakon ispiranja sa 2-butanolom, odnosno *tert*-butanolom [78]. Samukawa i saradnici su pokazali da se metanoliza znatno brže odigravala kada se enzim Novozyme 435 pre reakcije inkubira u metil oleatu 30 min, a zatim u sojinom ulju 12 sati [79].

Jedno od osnovnih pitanja je kako uticati na enzimski katalizovane reakcije transesterifikacije da bi one jednog dana postale industrijski prihvatljiv proces dobijanja biodizela. Zbog toga neophodno je sprečavati inaktivaciju enzima viškom metanola. Do sada razvijen pristup, postepeno dodavanje metanola u reakcionu smesu, u skladu je sa dinamikom potrošnje metanola. Druga mogućnost je korišćenje drugih acil akceptora koji nemaju negativno dejstvo na enzim kao alkoholi kratkog lanca. Kao pogodan nukleofil u reakciji transesterifikacije su se pokazali metil- i etil-acetat [18,61,80]. Primenom ovih acil akceptora, za razliku od alkohola, omogućen je jednostepeni postupak sinteze biodizela i time znatno smanjeno vreme trajanja reakcije i njena kompleksnost. Takođe, primenom metil-acetata povećava se stabilnost biokatalizatora što omogućava njegovu višekratnu upotrebu. Naime, u reakciji sa metil-acetatom kao nusprodukt se ne stvara glicerol već triacetilglicerol koji nema negativan efekat na stabilnost lipaze [81,82]. Du i saradnici su dokazali da upotrebom metil-acetata kao akceptora nema gubitka aktivnosti lipaze i nakon stotog ciklusa reakcije [81].

Sledeći korak je sniženje cena lipaza što se može postići na nekoliko načina. Primarno je korišćenje imobilisanih lipaza čime se omogućava njihova višestruka primena u šaržnim i kontinualnim procesima. Radi se i na razvijanju postupaka korišćenja celih mikrobnih ćelija kao izvora lipaza umesto slobodnog enzima, čime se smanjuje cena proizvoda jer se olakšava separacija biokatalizatora [66,83]. Analiza je usmerena i ka razvoju takvih vrsta lipaza koje su otporne na metanol prisutan u višku. U reakcionoj smeši sa 10% metanola u odnosu na ulje, u jednostepenom postupku transesterifikacije, nije ostvaren prinos MEMK kada se koristila lipaza Novozym 435 dok je lipaza iz *Photobacterium lipolyticum* dala prinos MEMK od 70% u odnosu na teorijski [84].

ZAKLJUČAK

Lipaze dobijaju sve veći značaj u brojnim biotehnološkim procesima. Zahvaljujući sposobnosti da katalizuju reakciju transesterifikacije našle su primenu u sintezi biodizela. Pomoću lipaza moguće je ostvariti visoke prinose biodizela u energetski manje zahtevnim sistemima u odnosu na hemijski katalizovane procese. Kao biokatalizatori mogu se koristiti slobodne ili imobilisane lipaze. Prednost imaju imobilisani sistemi jer se na taj način dobija stabilan biokatalizator koji se može koristiti više puta u ponovljenim ciklusima što značajno smanjuje potrošnju enzima i troškove proizvodnog postupka. Lipaze još uvek nisu dobile industrijsku primenu u sintezi biodizela prevashodno zbog visoke cene enzima. Ipak, enzimski postupak je bolji sa ekološkog aspekta jer stvara znatno manje hemijskog otpada i ubraja se u tzv. „zelene postupke“ sinteze biodizela, koje će u budućnosti imati sve veći značaj i primenu.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije na finansijskoj pomoći u toku izrade ovoga rada (projekat TR-20064).

LITERATURA

- [1] S. Al-Zuhair, Biofuels Bioprod. Bioref. **1** (2007) 57–66.
- [2] A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi, V. Solinas, J. Biotechnol. **119** (2005) 291–299.
- [3] J.M. Marchetti, V.U. Miguel, A.F. Errazu, Renew Sust. Energy Rev. **11** (2007) 1300–1311.
- [4] O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić, V.B. Veljković, D.U. Skala, Bioresour. Technol. **99** (2008) 1131–1140.
- [5] M.I. Al-Widyan, A.O. Al-Shyoukh, Bioresour. Technol. **85** (2002) 253–256.
- [6] E. Lotero, Y. Liu, D.E. Lopez, K. Suwannakarn, D.A. Bruce, J.G. Goodwin, Jr., Ind. Eng. Chem. Res. **44** (2005) 5353–5363.
- [7] H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, J. Biosci. Bioeng. **92** (2001) 405–416.
- [8] F. Ma, M.A. Hanna, Bioresour. Technol. **70** (1999) 1–15.
- [9] B. Freedman, E.H. Pryde, T.L. Mounts, J. Am. Oil Chem. Soc. **61** (1984) 1638–1643.
- [10] O.S. Stamenković, M.L. Lazić, V.B. Veljković, D.U. Skala, Hem. Ind. **59** (2005) 49–59.
- [11] S.S. Šiler-Marinković, A.V. Tomašević, Lj.V. Mojović, S.D. Petrović, Hem. Ind. **50** (1996) 303–307.
- [12] O.S. Stamenković, M.L. Lazić, Z.B. Todorović, V.B. Veljković, D.U. Skala, Bioresour. Technol. **98** (2007) 2688–2699.
- [13] V.B. Veljković, O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić, D.U. Skala, Fuel **88** (2009) 1554–1562.
- [14] T.F. Dossin, M.-F. Reyniers, R.J. Berger, G.B. Marin, Appl. Catal B **67** (2006) 136–148.
- [15] I. Lukić, J. Krstić, D. Jovanović, D. Skala, Bioresour. Technol. **100** (2009) 4690–4696.

- [16] V. Rathore, G. Madras, *Fuel* **86** (2007) 2650–2659.
- [17] S. Glisic, D. Skala, J. Supercrit. Fluid **49** (2009) 293–301.
- [18] N. Ognjanović, D. Bezbradica, Z. Knežević-Jugović, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 5146–5154.
- [19] C.C. Akoh, S.W. Chang, G.C. Lee, J.F. Shaw, J. Agric. Food Chem. **55** (2007) 8995–9005.
- [20] N. Ognjanović, D. Bezbradica, Z. Knežević, J. Serb. Chem. Soc. **73** (2008) 147–156.
- [21] S. Shah, S. Sharma, M.N. Gupta, *Indian J. Biochem. Biophys.* **40** (2003) 392–399.
- [22] A. Pandey, S. Benjamin, C.R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V.T. Soccol, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29** (1999) 119–131.
- [23] D. Bezbradica, D. Mijin, S. Šiler-Marinković, Z. Knežević, *J. Mol. Catal. B* **45** (2007) 97–101.
- [24] Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, S. Branković-Dimitrijević, D. Mijin, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 1139–1151.
- [25] R. Lortie, *Biotechnol. Adv.* **15** (1997) 1–15.
- [26] V.M. Balcao, A.L. Paiva, X.F. Malcata, *Enzym. Microb. Technol.* **18** (1996) 392–416.
- [27] X. Malcata, H. Reyes, H. Garcia, C. Hill, C. Amundson, *Enzyme Microb. Technol.* **14** (1992) 426–446.
- [28] Z.D. Knežević, *Imobilisane lipaze kao katalizatori, Biblioteka Disertatio, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2004.*
- [29] R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64** (2004) 763–781.
- [30] K.E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 390–397.
- [31] S.H. Krishna, S. Divakar, S.G. Prapulla, N.G. Karanth, *J. Biotechnol.* **87** (2001) 193–201.
- [32] A.R.M. Yahya, W.A. Anderson, M. Moo-Yang, *Enzyme Microb. Technol.* **23** (1998) 438–450.
- [33] S. Benjamin, A. Pandey, *Yeast* **14** (1998) 1069–1087.
- [34] R.V. Muralidhar, R.R. Chirumamilla, R. Marchant, V.N. Ramachandran, O.P. Ward, P. Nigam, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18** (2002) 81–97.
- [35] M. Jensen, T. Jensen, K. Kjaer, T. Bjørnholm, O. Mouritsen, G. Peters, *Biophys. J.* **83** (2002) 98–111.
- [36] J. Pleiss, M. Fischer, R.D. Schmid, *Chem. Phys. Lipids* **93** (1998) 67–80.
- [37] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2006) 235–251.
- [38] R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **19** (2001) 627–662.
- [39] Z.D. Knežević, S.S. Šiler-Marinković, L.V. Mojović, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (1998) 267–271.
- [40] G. Antolin, F.V. Tinaut, Z. Briceno, V. Castano, C. Perez, A.I. Ramirez, *Bioresour. Technol.* **83** (2002) 111–114.
- [41] M. Mohamed, B. Soumanoua, T. Uwe, A. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **33** (2003) 97–103.
- [42] B. Freedman, R.O. Butterfield, E.H. Pryde, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (1986) 1375–1380.
- [43] H. Nouredini, D. Zhu, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74** (1997) 1457–1463.
- [44] D. Darnoko, M. Cheryan, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77** (2000) 1263–1267.
- [45] L. Zou, S. Atkinson, *Environ. Technol.* **24** (2003) 1253–1260.
- [46] S. Shah, M.N. Gupta, *Process Biochem.* **42** (2007) 409–414.
- [47] S.F.A. Halim, A.H. Kamaruddin, W.J.N. Fernando, *Bioresour. Technol.* **200** (2009) 710–716.
- [48] F. Yagiz, D. Kazan, A.N. Akin, *Chem. Eng. J.* **134** (2007) 262–267.
- [49] A.V. Tomašević, S.S. Šiler-Marinković, *Fuel Proc. Technol.* **81** (2003) 1–6.
- [50] Y. Chen, B. Xiao, J. Chang, Y. Fu, P. Lv, X. Wang, *Energy Conver. Man.* **50** (2009) 668–673.
- [51] P.D. Patila, S. Deng, *Fuel* **88** (2009) 1302–1306.
- [52] G. Knothe, *INFORM* **13** (2002) 900–903.
- [53] W. Parawira, *Crit. Rev. Biotechnol.* **29** (2009) 82–93.
- [54] S.V. Ranganathan, S.L. Narasimhan, K. Muthukumar, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 3975–3981.
- [55] Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, N. Ognjanovic, *New Biotechnol.* **25** (2009) 159–160.
- [56] C. Mateo, J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **40** (2007) 1451–1463.
- [57] A.F. Hsu, K.C. Jones, T.A. Foglia, W.N. Marmer, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81** (2004) 749–752.
- [58] Z. Knežević-Jugović, *Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008.*
- [59] Z. Knežević, N. Milosavić, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, R. Prodanović, *Biochem. Eng. J.* **30** (2006) 269–278.
- [60] N. Dizge, B. Keskinler, *Biomass Bioenerg.* **32** (2008) 1274–1278.
- [61] M.K. Modi, J.R.C. Reddy, B.V.S. K. Rao, R.B.N. Rasad, *Bioresour. Technol.* **98** (2007) 1260–1264.
- [62] M.M. Soumanou, U.T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **33** (2003) 97–103.
- [63] S. Al-Zuhair, W.L. Fan, S.J. Lim, *Process Biochem.* **42** (2007) 951–960.
- [64] D. Bezbradica, D. Mijin, S. Šiler-Marinković, Z. Knežević, *J. Mol. Catal. B* **38** (2006) 11–16.
- [65] G.V. Chowday, S.G. Prapulla, *Process Biochem.* **38** (2002) 393–397.
- [66] S. Tamalampudi, M.R. Talukder, S. Hama, T. Numata, A. Kondo, H. Fukuda, *Biochem. Eng. J.* **39** (2007) 185–189.
- [67] L.A. Nelson, T.A. Foglia, W.N. Manner, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73** (1996) 1191–1295.
- [68] K. Nie, F. Xie, F. Wang, T. Tan, *J. Mol. Catal. B* **43** (2006) 142–147.
- [69] M. Iso, B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, *J. Mol. Catal. B* **16** (2001) 53–58.
- [70] L. Li, W. Du, D. Liu, L. Wang, Z. Li, *J. Mol. Catal. B* **43** (2006) 58–62.
- [71] D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder, S. Locatelli, *Biores. Technol.* **98** (2007) 648–653.
- [72] H. Nouredini, X. Gao, R.S. Philkana, *Biores. Technol.* **96** (2005) 769–777.

- [73] O. Kose, M. Tuter, H.A. Aksoy, *Bioresour. Technol.* **81** (2002) 125–129.
- [74] Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** (1999) 789–793.
- [75] Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara, Y. Tominaga, *J. Mol. Catal. B* **17** (2002) 133–142.
- [76] Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77** (2000) 355–360.
- [77] Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** (1999) 789–793.
- [78] J.W. Chen, W.T. Wu, *J. Biosci. Bioeng.* **95** (2003) 466–469.
- [79] T. Samukawa, M. Kaieda, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, H. Fukuda, *J. Biosci. Bioeng.* **90** (2000) 180–183.
- [80] N. Ognjanović, S. Šaponjić, D. Bezbradica, Z. Knežević, *Acta Periodica Technologica* **39** (2008) 161–169.
- [81] W. Du, Z. Xu, D. Liu, J. Zeng, *J. Mol. Catal. B* **30** (2004) 125–129.
- [82] Z. Xu, W. Du, D. Liu, *J. Mol. Catal. B* **32** (2005) 241–245.
- [83] W. Li, W. Du, D. Liu, *J. Mol. Catal. B* **45** (2007) 122–127.
- [84] K.S. Yang, J.H. Sohn, H.K. Kim, *J. Biosci. Bioeng.* **107** (2009) 599–604.

SUMMARY

LIPASES AS BIOCATALYSTS FOR BIODIESEL PRODUCTION

Nevena D. Ognjanović, Slobodan D. Petrović, Dejan I. Bezbradica, Zorica D. Knežević-Jugović

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia

(Review paper)

Lipases can be used for a variety of biotechnological applications: synthesis of fine chemicals, therapeutics, agrochemicals, cosmetics, flavors, biopolymers and biodiesel. Biodiesel is an alternative fuel for diesel engines that is environmentally acceptable. Conventionally, biodiesel is produced by transesterification of triglycerides and short chain alcohols in the presence of an acid or an alkaline catalyst. There are several problems associated with this kind of production that can be resolved by using lipase as the biocatalyst. The usage of lipases has several advantages over the conventional chemical methods. It is considered as less energy intensive and environmentally friendly. However, there are two main obstacles associated with the effective utilization of lipases in the production of biodiesel. The main one is the cost of the enzyme and its poor stability in the presence of excess alcohol. Several strategies are proposed to overcome these drawbacks: immobilization of lipases, stepwise addition of alcohol, and the usage of novel acyl acceptors and the usage of whole cell biocatalysts.

Ključne reči: Lipaze • Biodizel • Transesterifikacija • Estri
Key words: Lipases • Biodiesel • Transesterification • Esters