



Mikrobiologiczne metody otrzymywania biodiesla

Ewa Białecka-Florjańczyk¹, Izabela Stolarzewicz¹, Dawid Kucharski²

¹ Katedra Chemii Wydziału Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

² Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Biodiesel obtained by microbiological methods

Summary

Biodiesel – a fuel for diesel engines – represents an alternative environment-friendly source of energy obtained from renewable materials. Biodiesel is produced in triacylglycerol transesterification by alcohols such as methanol or ethanol and comprises fatty acid methyl and ethyl esters. For ecological reasons, the enzymatic transesterification is becoming of increasing interest, yet high price of enzymes obstructs its full industrial application. This work presents the latest achievements in biodiesel enzymatic production that refer both to isolated lipases as well as microorganisms that synthesize these enzymes. In the latter case, the work focuses on methods that allow for increasing biocatalyst activity and stability through changes in microorganism culture conditions, their immobilization and application of genetic engineering techniques.

Key words:

biodiesel, transesterification, lipases, microorganisms, genetic engineering.

Adres do korespondencji

Ewa Białecka-Florjańczyk,
Katedra Chemii,
Wydział Nauk o Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul Nowoursynowska 166,
02-787 Warszawa;
e-mail
Ewa_Bialecka_Florjanczyk
@sggw.pl

1. Wstęp

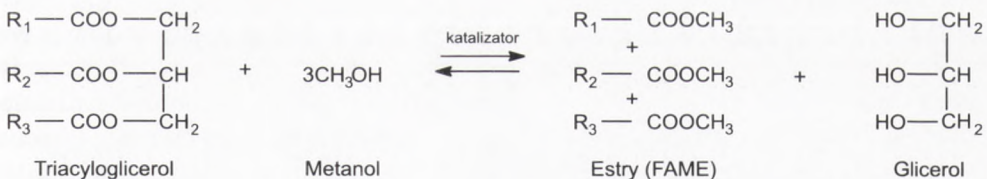
Biopaliwa, czyli paliwa otrzymane w wyniku przetwarzania produktów roślinnych cieszą się coraz większym zainteresowaniem ze względu na wyczerpujące się zasoby ropy naftowej i rosnące zagrożenie środowiska naturalnego. Biopaliwa ciekłe są otrzymywane na drodze fermentacji alkoholowej lub chemicznej przeróbki olejów roślinnych. Próbowano również stosować jako paliwa oleje roślinne w naturalnej postaci (już Rudolf Diesel na

wystawie światowej w Paryżu w 1900 r. przedstawił silnik napędzany olejem z orzeszków ziemnych), jednak ze względu na dużą lepkość, niską liczbę cetanową, znaczną zawartość wolnych kwasów tłuszczowych i zmiany zachodzące w czasie ich przechowywania nie uzyskały one większego praktycznego znaczenia. O wiele korzystniejsze właściwości mają estry wyższych kwasów tłuszczowych i krótkołańcuchowych alkoholi (do czterech atomów węgla w cząsteczce) (1), które popularnie nazywane są biodieslem. Ma on w porównaniu z paliwami bazującymi na ropie naftowej następujące zalety:

- 1) jest otrzymywany z materiałów roślinnych tzn. surowca odnawialnego, a zatem nie przyczynia się do wzrostu emisji dwutlenku węgla,
- 2) ulega biodegradacji i nie jest toksyczny,
- 3) może być produkowany z lokalnego surowca roślinnego, odpowiedniego dla danej szerokości geograficznej,
- 4) przy spalaniu daje mniej zanieczyszczeń, takich jak tlenek węgla(II), tlenki siarki i sadza (1).

Biodiesel otrzymywany jest w reakcji transestryfikacji triacylogliceroli, występujących w olejach roślinnych i tłuszczach zwierzęcych, alkoholami – głównie metanolem lub etanolem (schemat 1). Powstają wówczas estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME, ang. *Fatty Acid Methyl Esters*) i estry etylowe kwasów tłuszczowych (FAEE, ang. *Fatty Acid Ethyl Esters*). Reakcje transestryfikacji wymagają zastosowania katalizatorów – na skalę przemysłową używane są katalizatory zasadowe lub kwasowe, zależnie od rodzaju oleju roślinnego wykorzystanego do produkcji biodiesla (transestryfikacja chemiczna). Jednakże coraz większą rolę zaczynają odgrywać metody mikrobiologiczne (transestryfikacja enzymatyczna) polegające na działaniu enzymów zarówno wyizolowanych, jak i wydzielanych bezpośrednio do środowiska reakcji, przez odpowiednie mikroorganizmy (2).

Wszystkie te metody są przedmiotem wielkiego zainteresowania w ostatnich latach, o czym może świadczyć duża liczba prac przeglądowych w literaturze anglojęzycznej na temat metod syntezy biodiesla (3-6).



Schemat 1. Reakcja transestryfikacji triacyloglicerolu z metanolem.

2. Metody transestryfikacji stosowane w produkcji biodiesla

W przemysłowych metodach produkcji biodiesla wykorzystywane są głównie katalizatory zasadowe, przede wszystkim wodorotlenek sodu lub potasu. Reakcja prowadzona jest przez kilka godzin w temperaturze 40-65°C, w nadmiarze alkoholu, który w tym przypadku spełnia rolę rozpuszczalnika (7). Stosowane są także alkohole oraz węglany sodu lub potasu, które pozwalają osiągnąć dużą wydajność w reakcji transestryfikacji, ale wymagają bezwodnych substratów w celu wyeliminowania hydrolizy. Ponadto oleje roślinne poddawane transestryfikacji nie powinny zawierać wolnych kwasów tłuszczowych (< 0,5%) (1), ponieważ w obecności zasady tworzą się ich sole – mydła. Prowadzi to do zużycia katalizatora, a obecność mydła powoduje powstawanie emulsji lub żelu, co utrudnia wydzielanie produktu (8).

Katalizatory kwasowe używane są rzadziej ze względu na ich właściwości korozyjne i relatywnie małą szybkość reakcji, które katalizują (8). Wydajna synteza biodiesla z użyciem powszechnie stosowanych kwasów, takich jak chlorowodorowy, siarkowy, fosforowy i organiczne kwasy sulfonowe (np. *p*-toluenosulfonowy) wymaga temperatury 55-80°C oraz użycia trzydziestokrotnego nadmiaru molowego alkoholu w stosunku do triglicerydów (9).

Prowadzone są również prace nad zastosowaniem katalizatorów heterogenicznych, zarówno zasadowych jak i kwasowych, takich jak tlenek cyny(II), tlenki metali I i II grupy czy zeolity (10).

Pomimo że stosowanie katalizatorów chemicznych umożliwia osiągnięcie wydajności syntezy na poziomie 98% (9), to jednak metoda ta ma wiele wad, do których można zaliczyć: znaczne zapotrzebowanie na energię i metanol (lub etanol), trudności w izolacji produktu i usuwaniu glicerolu oraz duże ilości zasadowych ścieków w przypadku katalizy zasadowej lub dużą korozyjność w procesie katalizowanym kwasem (11). Czynniki te powodują, że kataliza chemiczna nie jest przyjazna środowisku naturalnemu.

Alternatywę dla transestryfikacji chemicznej stanowią metody enzymatyczne, polegające na wykorzystaniu lipaz czyli hydrolaz acyloglicerolowych (EC 3.1.1.3), katalizujących rozkład lub syntezę estrów glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych. Lipazy wykazują aktywność hydrolityczną w roztworach wodnych, natomiast w środowisku rozpuszczalników niewodnych położenie stanu równowagi reakcji przesuwa się w stronę syntezy estrów lub transestryfikacji (12). Większość lipaz stosowanych w reakcjach chemicznych jest produkowana przez mikroorganizmy takie jak bakterie, pleśnie czy drożdże.

Enzymatyczna produkcja biodiesla możliwa jest przy użyciu zarówno lipaz wyizolowanych, jak i całych mikroorganizmów produkujących te enzymy. W obu przypadkach procesem ułatwiającym wydzielenie i oczyszczanie produktów jest immobilizacja, która pozwala na wielokrotne użycie katalizatora, a często także podnosi wydajność reakcji (13). Dodatkowo aktywność katalityczną mikroorganizmów można zwiększać stosując modyfikacje genetyczne (14), wpływające zarówno na jakość

jak i na ilość wydzielanych przez nie enzymów. W porównaniu z metodami chemicznymi, transestryfikacja enzymatyczna charakteryzuje się przede wszystkim brakiem odpadów niebezpiecznych dla środowiska, mniejszym zapotrzebowaniem na energię oraz łatwiejszym usuwaniem glicerolu z mieszaniny reakcyjnej (15,16).

3. Zastosowanie wyizolowanych lipaz

W syntezie biodiesla najszerzej stosowane były lipazy z *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica* (Novozym 435) i *Pseudomonas cepacia*, które skutecznie katalizują reakcje transestryfikacji rozmaitych olejów alkoholami pierwszorzędowymi (17-19). Aktywność katalityczna enzymów zależy od rodzaju i formy (immobilizacja) użytej lipazy – różnią się one selektywnością, reaktywnością w stosunku do alkoholi pierwszo- i drugorzędowych oraz odpornością na inhibicję metanolem. Iso i wsp. (20) donieśli o czterokrotnie większej aktywności katalitycznej immobilizowanej lipazy z *Pseudomonas fluorescens* w porównaniu z lipazami syntetyzowanymi przez *P. cepacia*, *M. javanicus*, *C. rugosa* czy *R. niveus*. Inna lipaza, syntetyzowana przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* szczep B68, osiąga najwyższą aktywność w temperaturze 20°C. Luo i wsp. (21) przeprowadzili z jej udziałem reakcję transestryfikacji oleju sojowego z metanolem, osiągając w temperaturze 20°C wydajność konwersji do estrów metylowych równą 92%. Wykorzystanie tej nowej lipazy w przemysłowej produkcji biodiesla umożliwi znaczą redukcję kosztów, ponieważ obniżenie temperatury procesu ze stosowanych obecnie od 35-50°C do 20°C zmniejszy zapotrzebowanie na energię. W stosunku do olejów, w skład których wchodzi większa ilość wolnych kwasów tłuszczowych (oleje odpadowe i nierafinowane) zastosowano hybrydową technologię łączącą hydrolizę enzymatyczną oleju z transestryfikacją katalizowaną kwasami (22).

Reakcje transestryfikacji z udziałem enzymów można prowadzić zarówno w rozpuszczalnikach (eter naftowy, heksan) (23) jak i w układach bezrozpuszczalnikowych (19). W tym ostatnim przypadku wydajność, katalizowanej przez lipazę Novozym 435, reakcji otrzymywania estrów etylowych i butylowych wyniosła ok. 80%, natomiast estrów metylowych powstały jedynie śladowe ilości (ok. 3%). Podobną zależność zaobserwował Abigor i wsp. (24), który w swoich badaniach wykorzystali lipazę z *Pseudomonas cepacia* do przeprowadzenia reakcji transestryfikacji oleju palmowego z różnymi rodzajami alkoholi. Najwyższy stopień konwersji do estrów wyższych kwasów tłuszczowych uzyskano dla etanolu (72%); natomiast dla metanolu wynosił on tylko 15%, a przyczyną tego była dezaktywacja enzymu przez metanol. Dezaktywacja zdaniem autorów wynika z różnicy lepkości alkoholi, wpływającej na efektywny kontakt lipaz z substratami. Obecnie prowadzone są liczne prace badawcze w celu zwiększenia efektywności reakcji metanolizy, ponieważ metanol jest powszechnie stosowanym substratem do produkcji biodiesla na skalę przemysłową, ze względu na niską cenę oraz dużą dostępność. Okazało się, że dezaktywacji enzymu

można zapobiegać poprzez stopniowe dozowanie metanolu (25), co pozwala osiągnąć wydajność konwersji do FAME na poziomie 98%. Watanabe i wsp. (26) zaproponowali dwustopniowe dodawanie metanolu do roztworu zawierającego lipazę Novozym 435. Wysoka aktywność enzymu (wydajność FAEE 95%) pozostała wówczas na niezmiennym poziomie przez 70 cykli reakcyjnych. Korzystny wpływ miała też wstępna preinkubacja enzymu w oleinianie metylu przez 0,5 h, a później w oleju sojowym przez 12 h (27). Inhibujący wpływ metanolu można także zminimalizować stosując dodatek *tert*-butanolu jako rozpuszczalnika. W układzie 54% oleju z nasion bawełny, 13,5% metanolu i 32,5% *tert*-butanolu w obecności lipazy z *Candida antarctica* otrzymano FAME z wydajnością 97% (28).

Enzym może być również dezaktywowany przez powstający w reakcji glicerol. W celu zminimalizowania tego efektu, glicerol należy usuwać w trakcie trwania procesu, np. metodą dializy do fazy wodnej (29) lub przemywając zimmobilizowany enzym izopropanolem po każdym cyklu reakcyjnym (30). Optymalizację warunków produkcji biodiesla przeprowadzono dla procesu transestryfikacji ciągłej i periodycznej z udziałem lipazy Novozym 435 (31). W procesie ciągłym przy zastosowaniu kolumn wypełnionych enzymem oraz usuwaniu glicerolu za pomocą hydrocyklonu, uzyskano poziom konwersji dla oleju roślinnego i oleju odpadowego wynoszący odpowiednio 93 i 92%, natomiast proces periodyczny dawał maksymalną wydajność 96% przy dodawaniu metanolu w trzech porcjach. Dodatkowo stwierdzono, że immobilizowana lipaza zachowuje swoją aktywność przez 20 dni trwania reakcji, zatem metoda ta może być wykorzystana na skalę przemysłową (31).

Obecnie trwają też badania nad zastosowaniem innych niż alkohole, akceptorów grup acylowych w celu zwiększenia efektywności procesu transestryfikacji. Du i wsp. (32) zaproponowali użycie octanu metylu do przeprowadzenia transestryfikacji oleju sojowego, katalizowanej przez lipazę Novozym 435. Nadmiar octanu metylu nie powoduje dezaktywacji enzymu, a wydajność reakcji przy stosunku molowym reagentów 12:1 (octan metylu : olej) wyniosła 92%, zarówno dla oleju rafinowanego jak i surowego, podczas gdy w przypadku użycia metanolu z oleju surowego powstają jedynie śladowe ilości estrów metylowych. Dodatkowo aktywność enzymu w reakcji z octanem metylu pozostała na niezmiennym poziomie nawet po 100 cyklach reakcyjnych. Podobne warunki zastosował Lipkowski i wsp. (33) uzyskując biopaliwo, w skład którego wchodziły wszystkie produkty reakcji, tj. FAME oraz triacytylglicerol.

Z kolei octan etylu dla olejów z jatrofy i słonecznika pozwala uzyskać wydajność transestryfikacji przy udziale lipazy Novozym 435 na poziomie 90% (34). W porównaniu do procesu etanolizy, wysokie stężenie octanu etylu w roztworze (stosunek molowy octanu do oleju wynosił 11:1) nie miało wpływu na spadek aktywności enzymu nawet po 12 cyklach. Zatem można przypuszczać, że alternatywne akceptory grup acylowych, ze względu na wysoką efektywność oraz utrzymanie stabilności immobilizowanych enzymów w kolejnych cyklach reakcyjnych pozwolą na znaczną redukcję kosztów enzymatycznej produkcji biodiesla.

4. Zastosowanie mikroorganizmów produkujących lipazy

Podstawowym problemem w enzymatycznej produkcji biodiesla na skalę przemysłową jest koszt biokatalizatora. Przygotowanie lipaz w postaci wolnej lub immobilizowanej wymaga skomplikowanych procesów izolacji, oczyszczenia i unieruchomienia na nośnikach, powodując wzrost kosztów. Bezpośrednie wykorzystanie lipaz produkowanych przez komórki mikroorganizmów jako biokatalizatorów transestryfikacji pozwoliłoby na zwiększenie efektywności reakcji i znaczne zmniejszenie jej kosztów. Badania w tej dziedzinie koncentrują się głównie na lipazach wydzielanych przez *Rhizopus oryzae* i *Rhizopus chinensis*.

Przy zastosowaniu mikroorganizmów produkujących lipazy szczególnie istotny jest problem przenikania enzymów do środowiska reakcji, co jest związane z budową błony komórkowej, a szczególnie z jej składem (35). Hama i wsp. (36) zbadali wpływ budowy błony komórkowej *Rhizopus oryzae* na stabilność całokomórkowych biokatalizatorów i przebieg reakcji metanolizy. Skład błony komórkowej może być kontrolowany poprzez dodanie do medium hodowlanego różnych rodzajów kwasów tłuszczowych. Komórki, hodowane na podłożu wzbogaconym w kwas oleinowy i linolowy, czyli kwasy nienasycone, wykazywały wyższą aktywność w reakcji metanolizy, podczas gdy komórki, których błona komórkowa została wzbogacona w kwas palmitynowy, należący do kwasów nasyconych, charakteryzowały się większą stabilnością enzymatyczną. Optymalny stosunek zawartości kwasów nienasyconych do ogólnej ilości kwasów tłuszczowych (kwas oleinowy / kwas oleinowy + kwas palmitynowy) został określony na poziomie 0,67 jako kompromis między dążeniem do wysokiej aktywności i większej stabilności biokatalizatorów. Proporcja ta pozwalała na uzyskanie po 10 cyklach reakcyjnych wydajności metanolizy na poziomie 55%. Również korzystny wpływ dla *Rhizopus chinensis* (37) ma dodatek do podłoża oliwy z oliwek, a także wstępne potraktowanie grzybni preparatem Yatalase™, który częściowo degraduje ścianę komórkową grzybów, umożliwiając kontakt lipazy związanej z błoną komórkową ze środowiskiem reakcji. Zabieg taki korzystnie wpływa na aktywność wydzielanych enzymów (wzrost o 25%). Natomiast wstępne traktowanie grzybni izooktanem (37) pozwoliło uzyskać aktywność równą 139% w stosunku do aktywności liofilizowanej lipazy, określonej na poziomie 100%. Również zastosowanie acetonu pozwala zwiększyć aktywność enzymu, ale jego stabilność wówczas jest mniejsza niż w przypadku izooktanu. Zabiegi te w pewnym stopniu, jak się wydaje, mogą zastąpić proces liofilizacji w przygotowaniu biokatalizatorów, użytych w bezwodnych środowiskach reakcji (37).

Ban i wsp. (38) zbadali wpływ warunków hodowli i zawartości wody w środowisku na efektywność grzybni *Rhizopus oryzae* immobilizowanej na nośnikach biomasy (BSP, ang. *Biomass Support Particles*) z pianki poliuretanowej. W reakcji metanolizy, przeprowadzonej w obecności 15% wody przy trzypięciowym dodaniu metanolu, wydajność estrów metylowych przekraczała 90%, co jest wartością porównywalną z procesami prowadzonymi przy użyciu wolnych enzymów. Potwierdzono również

pozytywny wpływ obecności kwasu oleinowego i oliwy z oliwek na właściwości tego typu biokatalizatorów posługując się badaniami wykorzystującymi sygnał fluorescencji uzyskany ze znakowanych przeciwciał, użytych do wykrycia lipazy (39).

Trwałość całokomórkowych biokatalizatorów zależy także od sposobu prowadzenia hodowli, a w szczególności od typu bioreaktora. Porównując hodowlę komórek *Rhizopus oryzae* immobilizowanych na nośnikach biomasy (BSP) prowadzoną w bioreaktorze typu *air-lift* (z mieszaniem pneumatycznym) oraz w kolbach na wstrząsarce stwierdzono, że w pierwszym przypadku całokomórkowe biokatalizatory charakteryzowały się większą aktywnością i trwałością w reakcji metanolizy (40).

W celu wyjaśnienia wpływu immobilizacji na różnicę w aktywności lipolitycznej *Rhizopus oryzae*, Hama i wsp. zastosowali metodę *western blotting* (39). *Rhizopus oryzae* produkuje dwa typy enzymów lipolitycznych, różniące się masą cząsteczkową oraz lokalizacją w komórce. Lipaza ROL34, której masa wynosi 34 kDa jest połączona ze ścianą komórkową, natomiast lipaza ROL31 (31 kDa) jest głównie związana z błoną komórkową. W trakcie hodowli zawiesinowej oba rodzaje lipaz są wydzielane na zewnątrz komórek i ilość ROL31 związanej z błoną komórkową szybko maleje. Inna sytuacja występuje w przypadku hodowli grzybni immobilizowanej w poliuretanowych nośnikach biomasy, gdzie duża ilość enzymu związanego z błoną pozostaje wewnątrz komórek nawet w końcowym etapie hodowli i tym samym jego sekrecja do roztworu jest zahamowana. W dalszym badaniu pokrewieństwa między oboma typami lipaz wykazano, że o lokalizacji danego typu lipazy w komórce ROL31 decyduje fragment enzymu, składający się z 28 aminokwasów, znajdujący się na N-końcu lipazy ROL34. Hipoteza ta została potwierdzona przez badaczy japońskich (41), którzy uwidocznili proces sekrecji lipazy *in vivo* wykorzystując połączenia ROL z białkiem GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*). W komórkach syntetyzujących ROL z sekwencją N28 (tzn. ROL34), podczas obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym pokazano, że białka transportowane są przez retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i ścianę komórkową, natomiast w przypadku braku sekwencji N28 obserwowano wysoką akumulację sygnału fluorescencji w cytoplazmie bez przemieszczania do ER.

Duże ilości ROL34 znajdują się w ścianie komórkowej niezależnie od rodzaju i stężenia substratu w medium hodowlanym. Inna sytuacja występuje w przypadku lipazy ROL31, której zawartość jest ściśle zależna od substratu i jest największa w przypadku dodania kwasu oleinowego lub oleju z oliwek do medium hodowlanego. Ponieważ aktywność lipaz w reakcji metanolizy zależy od ilości enzymu związanego z błoną komórkową należy dążyć do wzrostu ilości lipazy w tej właśnie lokalizacji (42).

Stosowanie biokatalizatorów całokomórkowych daje dobre rezultaty również w przypadku niewodnego środowiska reakcji (42). Li i wsp. (43) dla komórek *Rhizopus oryzae* w *tert*-butanolu, uzyskali wydajność konwersji na poziomie 72% i podwyższoną stabilność enzymu w kolejnych cyklach reakcyjnych. Dodatkowo stwierdzili, że obecność *tert*-butanolu eliminuje negatywny wpływ metanolu na wydajność pro-

cesu. Natomiast liofilizowane komórki *Rhizopus chinensis* (12) produkują lipazę (RCL), która wykazuje wysokie zdolności katalityczne w reakcji transestryfikacji oleju sojowego w układzie bezrozpuszczalnikowym (wydajność FAME równa 86%).

Hama i wsp. (44) prowadzili badania nad zastosowaniem bioreaktora ze złożem stacjonarnym w procesie enzymatycznej produkcji biodiesla na skalę przemysłową. Bioreaktory tego typu ograniczają spadek wydajności reakcji metanolizy w kolejnych cyklach, chroniąc tym samym immobilizowane komórki przed uszkodzeniem fizycznym i nadmiarem metanolu. Komórki z *Rhizopus oryzae* zostały unieruchomione wewnątrz prostopadłościennych, poliuretanowych nośników biomasy o wymiarach 6 mm × 6 mm × 3 mm, w czasie hodowli w 20-litrowym bioreaktorze typu *air-lift*. W trakcie doświadczenia przeprowadzono emulgowanie mieszaniny reakcyjnej ultradźwiękami, co pozwoliło zwiększyć powierzchnię wymiany masy między unieruchomionymi komórkami a roztworem, podnosząc wydajność reakcji do 75,5%. Zmieniano także objętościowe natężenie przepływu roztworu przez bioreaktor od 5 do 55 dm³/h. Najwyższą zawartość estrów metylowych (powyżej 90%) uzyskano w pierwszym cyklu reakcyjnym przy natężeniu przepływu 25 dm³/h i taka wysoka wartość (ok. 80%) została utrzymana nawet po 10 cyklach reakcyjnych. Zaobserwowano, że większe współczynniki przepływu powodują oderwanie się enzymu od złoża stacjonarnego, podczas gdy niższe powodują spadek aktywności enzymu z powodu nieefektywnego mieszania.

Szczególnie korzystny wpływ na stabilność biokatalizatorów ma sieciowanie zimmobilizowanych na BSP komórek za pomocą aldehydu glutarowego (GA) (45), które pozwala na zachowanie w trakcie sześciu cykli reakcyjnych wydajności syntezy rzędu 70-83% w każdym cyklu, podczas gdy bez sieciowania wydajność po sześciu cyklach spada do ok. 50%.

5. Metody inżynierii genetycznej w modyfikacji mikroorganizmów wykorzystywanych w produkcji biodiesla

Rozwój metod krystalografii rentgenowskiej i modelowania molekularnego doprowadził w ostatnich latach do określenia trójwymiarowej struktury wielu lipaz, co przy użyciu technik inżynierii genetycznej pozwala na zaprojektowanie enzymów posiadających nowe funkcje lub udoskonalenie właściwości już istniejących (46). W odniesieniu do enzymów katalizujących reakcje transestryfikacji dotyczy to specyficzności substratowej, tolerancji na niekorzystne oddziaływanie metanolu oraz stabilności w szerokim zakresie pH i temperatury. Matsumoto (12) poddał ekspresji gen lipazy (ROL) z *Rhizophus oryzae* IFO4697, wykazujący dużą aktywność katalityczną w reakcji transestryfikacji, w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Komórki drożdży są użytecznym narzędziem w konstrukcji całokomórkowych biokatalizatorów, ponieważ charakteryzują się stosunkowo sztywną ścianą komórkową, zachowującą swoją strukturę w obecności rozpuszczalników organicznych, a dodatkowo

można zwiększyć ich reaktywność w wyniku permeabilizacji. W przypadku permeabilizacji poprzez suszenie komórek powietrzem można uzyskać wydajność estrów metylowych 71%, po 165 godz. reakcji w temperaturze 37°C przy stopniowym dodawaniu metanolu. Zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych drożdży syntetyzujących wewnątrzkomórkowe enzymy i dalszy wzrost efektywności biokatalizatorów można również osiągnąć za pomocą izopropanolu lub etanolu (47).

W procesach biotechnologicznych na szeroką skalę wykorzystuje się możliwość ekspozycji obcych białek na powierzchni komórek mikroorganizmów. Matsumoto i in. (48), opracowali system ekspresji lipazy z *Rhizopus oryzae* (ROL) na powierzchni komórek drożdży, oparty na genie *FLO1*, który koduje lektynopodobne białko występujące w ścianie komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*. W rezultacie uzyskano ekspozycję zrekombinowanych lipaz z *R. oryzae* na powierzchni komórek drożdży, co zostało potwierdzone metodami mikroskopii immunofluorescencyjnej. Zastosowanie tak zmodyfikowanych genetycznie komórek drożdży jako całokomórkowych biokatalizatorów pozwoliło uzyskać wydajność estrów metylowych rzędu 78% (po 72 godzinach prowadzenia reakcji i przy trzystopniowym dodaniu metanolu do mieszaniny reakcyjnej). Wysoka wydajność tych biokatalizatorów związana jest prawdopodobnie z ułatwionym dostępem substratu do enzymu zlokalizowanego na powierzchni komórek, które w związku z tym nie wymagają uprzedniej permeabilizacji (48).

Prowadzone są również intensywne badania nad konstrukcją biokatalizatorów, wykorzystujących lipazy syntetyzowane przez inne drobnoustroje niż *Rhizopus oryzae*. Hama i wsp. (49), dokonali transformacji genomu pleśni *Aspergillus oryzae*, genem kodującym lipazę z *Fusarium heterosporum*, otrzymując transformanta zdolnego do syntezy aktywnej formy zrekombinowanej lipazy z *F. heterosporum* (FHL). Komórki zostały unieruchomione w porowatych, poliuretanowych nośnikach biomasy. Ponadto stwierdzono, że dodanie 5% wody do mieszaniny reakcyjnej najefektywniej chroniło lipazę przed inaktywacją metanolem i pozwalało na osiągnięcie końcowego stężenia estrów metylowych na poziomie 94% nawet po 10 cyklach reakcji. W badaniach porównawczych dowiedziono, że FHL produkowana przez *A. oryzae* osiąga wyższą wydajność i jest bardziej stabilna niż używana dotychczas lipaza z *R. oryzae*. Obie lipazy są wprawdzie *sn*-1,3-regiospecyficzne w stosunku do triacylogliceroli, ale o ile ROL kumuluje większe ilości izomerów *sn*-2 częściowych glicerydów, o tyle FHL produkowana przez *A. oryzae* ułatwia przemieszczanie się grup acylowych z pozycji *sn*-2 do *sn*-1(3) w diacyloglicerolach.

Omówione dotychczas metody mikrobiologicznej transestryfikacji stanowią szerokie spektrum nie tylko pod względem stosowanych enzymów czy produkujących je mikroorganizmów, lecz także różnią się rodzajem użytego surowca czy akceptora grup acylowych. Najbardziej reprezentatywne z nich wraz z wymienionymi danymi zestawiono w tabeli.

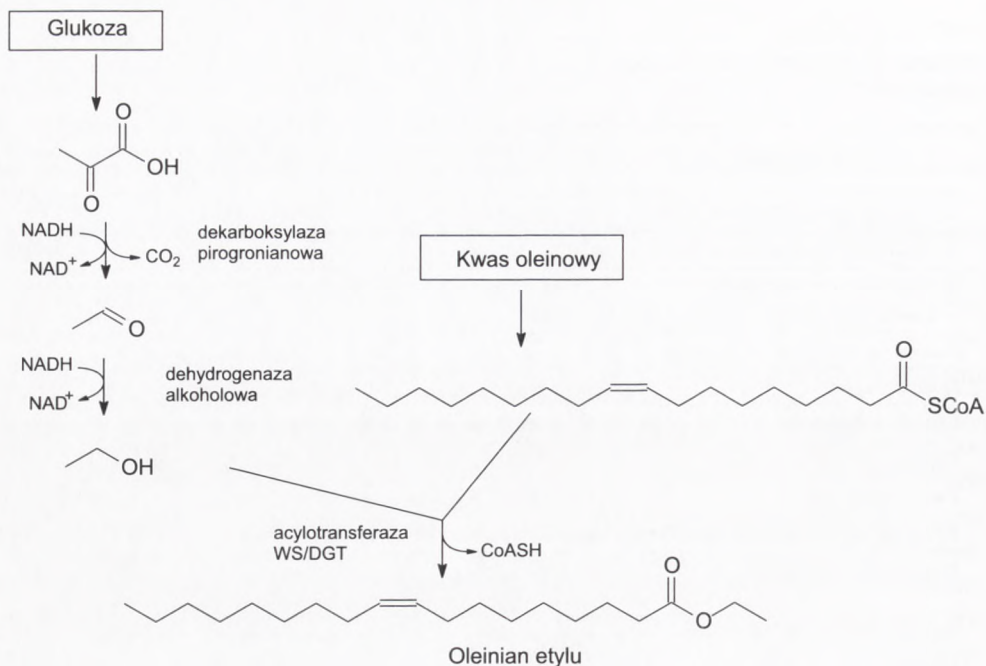
Tabela

Porównanie wydajności reakcji transestryfikacji z udziałem lipaz pochodzenia mikrobiologicznego jako katalizatorów

Źródło lipazy	Rodzaj oleju lub tłuszczu	Akceptor grup acylowych	Wydajność [%]	Materiał źródłowy
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) ^a	olej posmażalniczy	metanol	90	(3)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) ^a	olej z jatrofy	octan etylu	91	(34)
<i>Pseudomonas cepacia</i> (PS 30) + <i>Candida antarctica</i> (SP 435) ^a	tłuszcz zwierzęcy	etanol	85,4	(51)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (LipB68) ^a	olej sojowy	metanol	92	(30)
<i>Candida rugosa</i> ^a	olej rzepakowy	2-etyloheksan-1-ol	98	(16)
<i>Candida cylindracea</i> ^a	odpadowa ziemia okrzemkowa	metanol	~100	(52)
<i>Cryptococcus</i> spp. S – 2 ^a	olej z otrębów ryżowych	metanol	80	(50)
<i>Pseudomonas epacia</i> ^a	olej z jatrofy	etanol	98	(53)
<i>Rhizopus miebei</i> (lipozym IM-77) ^a	olej sojowy	metanol	92,2	(54)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^a	trioleinian gliceryny	butanol propanol	90 90	(29)
<i>Rhizopus oryzae</i> (BSP) ^b	olej z jatrofy	metanol	80	(55)
<i>Rhizopus oryzae</i> (BSP) ^b	olej sojowy	metanol	90	(44)
<i>S. cerevisiae</i> (wewnątrzkomórkowa ROL) ^b	olej sojowy	metanol	71	(12)
<i>S. cerevisiae</i> (ekspresja ROL na powierzchni komórki) ^b	olej sojowy	metanol	78	(48)

^a Lipaza w postaci wyizolowanej; ^b lipaza wydzielana bezpośrednio do środowiska reakcji przez odpowiedni mikroorganizm.

Interesujące wyniki badań nad syntezą *de novo* estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych (FAEE) z łatwo dostępnych surowców roślinnych, takich jak skrobia, celuloza i hemiceluloza, przedstawili Kalscheuer i wsp. (56). Autorzy zastosowali do tak otrzymanego paliwa nazwę „microdiesel”. Biosynteza estrów etylowych została przeprowadzona bezpośrednio w komórkach *Escherichia coli* o zmodyfikowanym genetycznie metabolizmie. Rezultat ten osiągnięto przez heterologiczną ekspresję w komórkach *E. coli*, genów dekarboksylazy pirogronianowej i dehydrogenazy alkoholowej z *Zymomonas mobilis* oraz niespecyficznego acylotransferazy (WS/DGAT) z *Acinetobacter baylyi* szczep ADP1. Zastosowanie zrekombinowanych enzymów z *Z. mobilis* umożliwiło zwiększoną syntezę etanolu w warunkach tlenowych. Natomiast acylotransferaza WS/DGAT wykazuje zdolność wykorzystania etanolu jako akceptora grup acylowych i dlatego została użyta jako katalizator etapu transestryfikacji tioestrów acetylo-CoA wyższych kwasów tłuszczowych z etanolem. Przebieg procesu przedstawiono na schemacie 2.

Schemat 2. Biosynteza FAEE w genetycznie zmodyfikowanych komórkach *E. coli*.

W fermentacji półciągłej, przeprowadzonej w warunkach tlenowych z użyciem odnawialnych źródeł węgla uzyskano stężenie estrów etylowych 1,28 g/dm³, co odpowiada ich zawartości na poziomie 26% suchej masy komórkowej. Głównym składnikiem otrzymanego w ten sposób biopaliwa był oleinian etylu, natomiast palmitynian i palmitoleinian etylu występowały w mniejszych ilościach. Pewne ograniczenia tej metody wynikają stąd, że w zastosowanych warunkach biosynteza *de novo* kwasów tłuszczowych nie jest wystarczająca i część reakcji była zależna od suplementacji egzogennych kwasów tłuszczowych. W produkcji „microdiesla” mogą być wykorzystane jako alternatywa bakterie z rodzaju *Actinomycetes*, ponieważ w zależności od źródła węgla mają zdolność do syntezy i wewnątrzkomórkowej kumulacji dużych ilości triacylogliceroli (powyżej 20% biomasy) (57). Innym czynnikiem ograniczającym wydajność produkcji estrów etylowych jest stosunkowo niska specyficzność WS/DGAT w stosunku do etanolu jako substratu. Obecnie trwają badania nad genami kodującymi homologi WS/DGAT zidentyfikowanymi u innych gatunków bakterii, które mogą wykazywać w stosunku do etanolu wyższą specyficzność substratową. Optymalizacja zaproponowanej metody pozwoli na obniżenie ceny paliwa i zmniejszy zużycie toksycznego metanolu.

6. Podsumowanie

Z przedstawionego w pracy tej przeglądu literatury wynika, że mikrobiologiczne metody produkcji biodiesla stają się obecnie ważnym kierunkiem badawczym w dziedzinie biopaliw. Procesy enzymatyczne są w pełni neutralne dla środowiska naturalnego, charakteryzują się niskim zapotrzebowaniem na energię oraz ułatwieniem skomplikowanych operacji usuwania reagentów i produktów z mieszaniny reakcyjnej. Główną przeszkodą w ich komercjalizacji są wysokie koszty otrzymywania lipaz, dlatego obecnie prowadzone są liczne badania nad zmniejszeniem kosztów i zwiększeniem efektywności enzymatycznej produkcji biodiesla. Można wyróżnić w nich następujące kierunki:

- przeciwdziałanie dezaktywacji enzymów przez substraty (metanol) lub produkty (glicerol),
- zastosowanie mikroorganizmów wytwarzających lipazy zamiast wydzielonych enzymów, co pozwala na uniknięcie kosztów związanych z procesami izolacji i oczyszczania lipaz,
- immobilizacja wolnych enzymów i mikroorganizmów wytwarzających lipazy, co przedłuża ich trwałość,
- wykorzystanie technik inżynierii genetycznej do projektowania nowych i wydajniejszych mikroorganizmów, produkujących lipazy.

W świetle przedstawionych danych, można przypuszczać, że połączenie wymienionych kierunków badań pozwoli w przyszłości na znaczne obniżenie kosztów mikrobiologicznej syntezy biopaliw, a co za tym idzie wdrożenie jej do produkcji biodiesla na skalę przemysłową.

Literatura

1. Fukuda H., Kondo A., Noda H., (2001), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(5), 405-416.
2. Ma F., Hanna M. A., (1999), *Bioresource Technology*, 70(1), 1-15.
3. Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y., (2002), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 133-142.
4. Kulkarni M. G., Dalai A. K., (2006), *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 2901-2931.
5. Antoni D., Zverlov V. V., Schwarz W. H., (2007), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 23-35.
6. Szczęśna-Antczak M., Kubiak A., Antczak T., Bielecki S., (2009), *Renewable Energy*, 34, 1185-1194.
7. Nouredini H., Zhu D., (1997), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(11), 1457-1463.
8. Sharma Y. C., Singh B., Upadhyay S. N., (2008), *Fuel*, 87(12), 2355-2373.
9. Marchetti J. M., Miguela V. U., Errazu A. F., (2007), *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(6), 1300-1311.
10. Walisiewicz-Niedbalska W., Kijeński J., Lipkowski A. W., Różycki K., (2006), *Przemysł Chemiczny*, 85(12), 1586-1591.
11. He Q., Xu Y., Teng Y., Wang D., (2008), *Chinese Journal of Catalysis*, 29(1), 41-46.
12. Matsumoto T., Takahashi S., Kaieda M., Ueda M., Tanaka A., Fukuda H., Kondo A., (2001), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 515-520.
13. Ranganathan S. V., Narasimhan S. L., Muthukumar K., (2008), *Bioresource Technology*, 99(10), 3975-3981.

14. Shaw J., Akoh C. C., Chang S., Lee G., (2007), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8995-9005.
15. Andrade J. B., Angelo C. P., Guarieiro L. L. N., Rezende M. J. C., Ribeiro N. M., Torres E. A., Lopes W. A., Pereira P. A. P., (2005), *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6b), 1313-1330.
16. Al-Zuhair S., (2007), *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 57-66.
17. Linko Y. Y., Lamsa M., Wu X., Uosukainen E., Seppala J., Linko P., (1998), *Journal of Biotechnology*, 66, 41-50.
18. Hernandez-Martin E., Otero C., (2008), *Bioresource Technology*, 99, 277-286.
19. Mittelbach M., (1990), *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 67(3), 168-170.
20. Iso M., Chen B., Eguchi M., Kudo T., Shrestha S., (2001), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.
21. Luo Y., Zheng Y., Jiang Z., Ma Y., Wei D., (2006), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(2), 349-355.
22. Ting W-J., Huang Ch-M., Giridhar N., Wu W-T., (2008), *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 38, 203-210.
23. Soumanou M. M., Bornscheuer U. T., (2003), *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 97-103.
24. Abigor R. D., Uadia P. O., Foglia T. A., Haas M. J., Jones K. C., Okpefa E., Obibuzor J. U., Bafor M. E., (2000), *Biochemical Society Transactions*, 28, 979-981.
25. Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y., (2002), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 133-142.
26. Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., (2000), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(4), 355-360.
27. Samukawa T., Kaieda M., Matsumoto T., Ban K., Kondo A., Shimada Y., Noda H., Fukuda H., (2000), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(2), 180-183.
28. Royon D., Daz G., Ellenrieher M., Locatelli S., (2007), *Bioresour. Technol.*, 98, 648-653.
29. Bélafi-Bakó K., Kovács F., Gubicza L., Hancsók J., (2002), *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(6), 437-439.
30. Xu Y. Y., Du W., Zeng J., Liu D., (2004), *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(1), 45-48.
31. Nie K., Xie F., Wang F., Tan T., (2006), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 142-147.
32. Du W., Xu Y., Liu D., Zeng J., (2004), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(3-4), 125-129.
33. Różycki K., Kijeński J., Walisiewicz-Niedbalska W., Lipkowski A. W., (2006), *Przemysł Chemiczny*, 85(12), 1592-1593.
34. Modi M. K., Reddy J. R. C., Rao B., (2007), *Bioresource Technology*, 98(6), 1260-1264.
35. Fukuda H., Hama S., Tamalampudi S., Noda H., (2008), *Trends in Biotechnology*, 26(12), 668-673.
36. Hama S., Yamaji H., Kaieda M., Oda M., Kondo A., Fukuda H., (2004), *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 155-160.
37. Wang D., Xu Y., Teng Y., (2007), *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(3), 147-155.
38. Ban K., Kaieda M., Matsumoto T., Kondo A., Fukuda H., (2001), *Biochemical Engineering Journal*, 8(1), 39-43.
39. Hama S., Tamalampudi S., Fukumizu T., Miura K., Yamaji H., Kondo A., Fukuda H., (2006), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(4), 328-333.
40. Oda M., Kaieda M., Hama S., Yamaji H., Kondo A., Izumoto E., Fukuda H., (2005), *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 45-51.
41. Hama S., Tamalampudi S., Shindo N., Numata T., Yamaji H., Fukuda H., Kondo A., (2008), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(6), 1009-1018.
42. Ward O. P., Nikolova P., (1993), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12(2), 76-86.
43. Li W., Du W., Li D., (2007), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3-4), 122-127.
44. Hama S., Yamaji H., Fukumizu T., Numata T., Tamalampudi S., Kondo A., Noda H., Fukuda H., (2007), *Biochemical Engineering Journal*, 34(3), 273-278.
45. Ban K., Hama S., Nishizuka K., Kaieda M., Matsumoto T., Kondo A., Noda H., Fukuda H., (2002), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17(3-5), 157-165.
46. Jaeger K. E., Eggert T., (2002), *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.

47. Kondo A., Liu Y., Furuta M., Fujita Y., Matsumoto T., Fukuda H., (2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 806-811.
48. Matsumoto T., Fukuda H., Ueda M., Tanaka A., Kondo A., (2002), *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4517-4522.
49. Hama S., Tamalampudi S., Suzuki Y., Yoshida A., Fukuda H., Kondo A., (2008), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 637-645.
50. Kamini N. R., Iefuji H., (2001), *Process Biochemistry*, 37(4), 405-410.
51. Wu W. H., Foglia T. A., Marmer W. N., Phillips J. G., (1999), *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(4), 517-521.
52. Kojama S., Dongning D., Sato M., Park E. Y., (2004), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 420-424.
53. Shah S., Gupta M. N., (2007), *Process Biochemistry*, 42(3), 409-414.
54. Shieh C. J., Liao H. F., Lee C. C., (2003), *Bioresource Technology*, 88(2), 103-106.
55. Tamalampudi S., Talukder M. R., Hama S., Numata T., Kondo A., Fukuda H., (2008), *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 185-189.
56. Kalscheuer R., Stölting T., Steinbüchel A., (2006), *Microbiology*, 152, 2529-2536.
57. Alvarez H., Steinbüchel A., (2002), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(4), 367-376.