

MILENA R. BRADIĆ<sup>1</sup>  
NEVENA D. OGNJANOVIĆ<sup>1</sup>  
DEJAN I. BEZBRADICA<sup>1</sup>  
SANJA Ž. GRBAVČIĆ<sup>1</sup>  
NATAŠA AVRAMOVIĆ<sup>2</sup>  
DUŠAN Ž. MIJIN<sup>1</sup>  
ZORICA D.  
KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tehnološko-metalurški fakultet,  
Univerzitet u Beogradu, Beograd  
<sup>2</sup>Institut za hemiju, Medicinski  
fakultet, Univerzitet u Beogradu,  
Beograd

PREGLEDNI RAD

UDK 547.426.1:66.094.941:66.09

DOI: 10.2298/HEMIND100510040B

## ENZIMSKA SINTEZA MONOACILGLICEROLA

*Monoacilgliceroli (MAG), zahvaljujući svojoj amfipatičnoj strukturi, imaju veliki značaj i primenu kao emulgatori u prehrambenoj industriji. Koriste se i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za pripremu emulzija ulje/voda (U/V) i za poboljšanje konzistencije krema i losiona. Konvencionalni hemijski postupci hidrolize masti imaju značajnih nedostataka jer se odvijaju na visokim temperaturama i pritiscima uz korišćenje neorganskih katalizatora. Pri ovako drastičnim procesnim uslovima, obrazuju se proizvodi promenjene boje i neprijatne arome, koji se moraju naknadno prečišćavati što poskupljuje proizvodnju. Enzimski postupci za dobijanje monoacilglicerola imaju značajnih prednosti, a to su pre svega blagi reakcioni uslovi, usmerenost reakcije kao i znatno manji troškovi za energiju. U ovom radu razmatrani su osnovni načini enzimskog dobijanja monoacilglicerola kao što su parcijalna hidroliza masti i ulja poziciono specifičnim lipazama, esterifikacija masnih kiselina i alkohola i gliceroliza masti i ulja, sa posebnim osvrtom na prednosti i nedostatke svakog od njih.*

Monoacilgliceroli (monogliceridi) jesu monoestri alkohola glicerola i masnih kiselina. Zahvaljujući svojoj amfipatičnoj strukturi, odnosno, sadržaju i lipofilnih (ostaci masnih kiselina) i hidrofilnih (hidroksilne) grupa, monoacilgliceroli su nejonske površinski aktivne materije na čemu se zasniva njihova velika primena u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Javljaju se u dva izomerna oblika u zavisnosti u kom položaju glicerolovog lanca je vezana masna kiselina ( $\alpha$ -,  $\beta$ - izomer).  $\beta$ -Monoacilgliceroli su mnogo nestabilniji i lako izomerizuju u prisustvu kiselina u industrijski značajnije  $\alpha$ -izomere. Mono- i diacilgliceroli masnih kiselina su jedni od najefikasnijih emulgatora u prehrambenoj industriji (E 471) koji se dodaju radi stvaranja postojanih emulzija željenih svojstava. Veoma su delotvorni u stvaranju stabilne disperzije šorteninga pri proizvodnji pekarskih testa, kolača i preliava, hleba, masnih namaza, sladoleda, mlečnih dezerta, proizvoda od mesa i sličnih proizvoda [1]. Imaju veliku primenu i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za pripremu emulzija ulje/voda (U/V) i za poboljšanje konzistencije krema i losiona.

Konvencionalno se proizvode hemijskim postupcima koji se odvijaju na visokim temperaturama (i do 250 °C) i pritiscima, uz korišćenje neorganskih katalizatora. Pri ovako drastičnim procesnim uslovima, nastaju proizvodi promenjene boje i neprijatne arome, koji se moraju naknadno prečišćavati metodama molekulske destilacije, što dodatno poskupljuje njihovu proizvodnju [2,3]. Sve veća primena monoacilglicerola i sve strožije regulative o uslovima upotrebe aditiva u namirnicama podstakli su intenzivna istraživanja enzimskih postupaka

proizvodnje, koji omogućavaju dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta, uštede energije i očuvanje životne sredine i prirodnih resursa.

Na osnovu pregleda velikog broja radova i patenata u ovoj oblasti, može se zaključiti da se lipaze, naročito mikrobne, već dugo ispituju kao potencijalni katalizatori u proizvodnji ovih važnih emulgatora [3,4]. Za ove procese su razvijeni različiti sistemi i uređaji, neki od njih i do nivoa komercijalne primene. Međutim, o primerima masovnih komercijalnih proizvodnji monoacilglicerola lipazama u potpuno kontrolisanim uslovima u svetu se još uvek ne može govoriti, dok kod nas do sada nisu realizovani ni eksperimentalni sistemi na nivou pilot postrojenja. Osnovni razlozi su mala aktivnost i stabilnost lipaza u industrijskim uslovima, visina cene i neekonomičan način njihove primene. Ovaj rad ima za cilj da prodiskutuje različite načine enzimske proizvodnje monoacilglicerola u velikom broju sistema sa lipazama, sa osvrtom na prednosti i nedostatke svakog od njih.

### HEMIJSKI POSTUPCI ZA DOBIJANJE MONOACILGLICEROLA

Monoacilgliceroli se uglavnom komercijalno dobijaju reakcijom transesterifikacije masti i glicerola, pri čemu nastaje ravnotežna smeša mono-, di- i triacilglicerola, glicerola i masnih kiselina. Ova reakcija se sreće u literaturi pod nazivom gliceroliza i obično se izvodi kao preliminarni proces kod pripremanja alkidnih smola u istim reaktorima koji se koriste za dalju reakciju sa smolama [2]. Za potrebe prehrambene industrije, monoacilgliceroli se pripremaju pažljivije u specijalnim reaktorima od nerđajućeg čelika, aluminijuma ili nikla, koji su snabdeveni mehaničkom mešalicom i opremom za snižen pritisak. U mast se dodaje 25–40% glicerola i 0,05–0,2% baznog katalizatora. Katalizator sa mastima stvara sapune koji povećavaju rastvorljivost glicerola u

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

E-pošta: zknez@tmf.bg.ac.rs

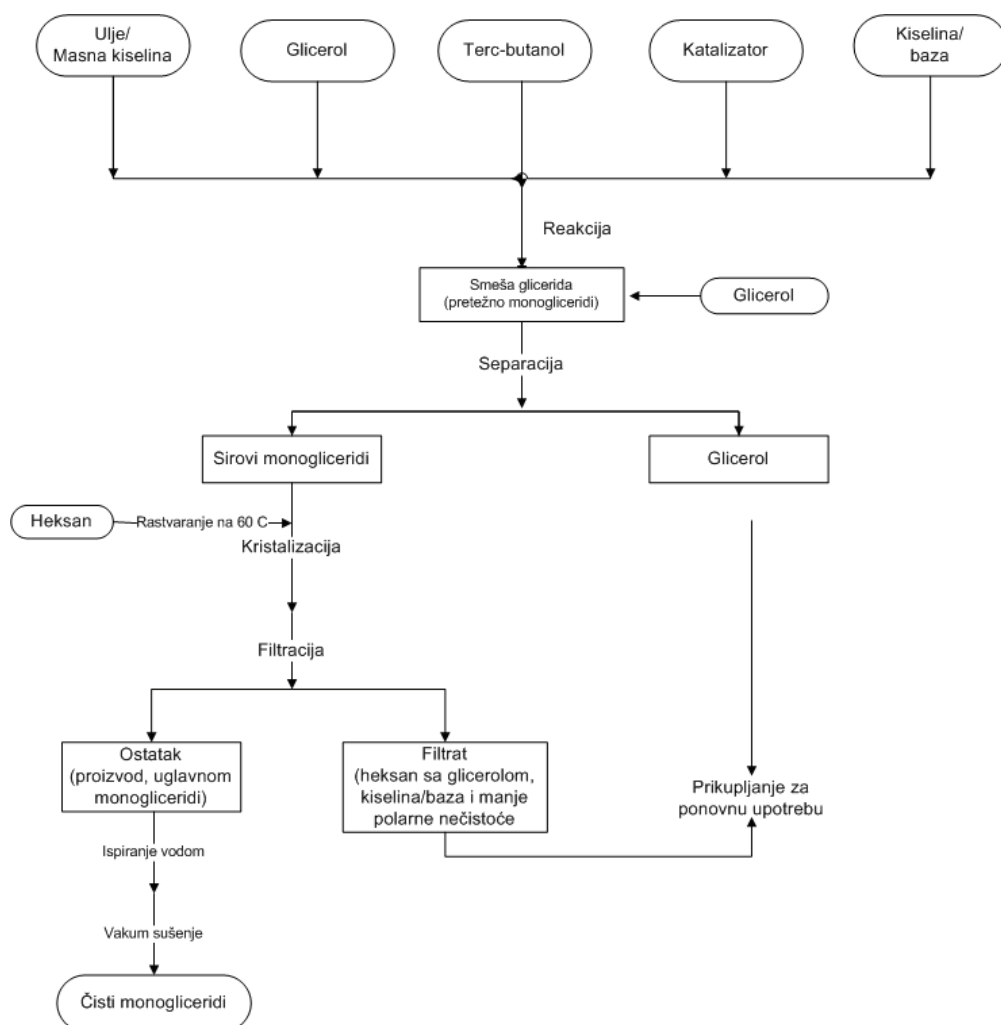
Rad primljen: 10. maj 2010.

Rad prihvaćen: 22. jun 2010.

masnoj fazi i na taj način ubrzavaju reakciju. Reakcija se izvodi na visokoj temperaturi, od 160 do 180 °C. Hildič (Hilditch) i Rig (Rigg) istakli su da je stepen konverzije reakcije ograničen zbog nemešanja glicerida i slobodnog glicerola [5]. Količina glicerola koja može biti iskorišćena zavisi od temperature i kreće se od 22,5% u odnosu na mast na 200 °C do 40% na 250 °C [2]. Dodatkom hemijskih katalizatora može se postići velika brzina reakcije na višim temperaturama, ali to ima druge neželjene efekte. Naime, usled neselektivnosti hemijskih katalizatora, stvaraju se brojni sporedni proizvodi, pa su zahtevi za prečišćavanjem finalnog proizvoda veliki [6,7]. Pri tome su prosečni prinosi monoacilglicerola relativno mali. Tako, reakciona smeša posle 1 h reakcije na 200-250 °C, sadrži 35–60% monoacilglicerola, 35–50% diacilglicerola, 1–20% triacilglicerola, 1–10% glicerola i 1–10% masnih kiselina i njihovih soli [8]. Teorijski prinos monoacilglicerola koji iznosi 70% ne može se ostvariti ni na temperaturi od 250 °C jer dolazi do polimerizacije i stvaranja neželjenih kondezacionih proizvoda koji sadrže vezani glicerol. Osim toga, ovakvi

hemijski procesi nisu pogodni za sintezu termolabilnih monoacilglicerola koji sadrže polinezasićene masne kiseline [9]. Ovi monoacilgliceroli se zahvaljujući velikim nutritivnim vrednostima sve više koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, pa stoga njihova sinteza ima veliki komercijalni značaj [6,7,10]. Proizvodi, koji sadrže oko 50% monoacilglicerola, moraju da se prečišćavaju molekulskom destilacijom što značajno povećava proizvodne troškove i pri tome se dobijaju destilati sa 90–97% monoacilglicerola.

U velikom broju patenata opisan je niz metoda za dobijanje jestivih monoacilglicerola, uključujući patente Edelera (Edeler) i Kristensena (Christensen), po kojima se reakcija između masti i glicerola odvija i bez prisustva katalizatora, ali će brzina reakcije biti dovoljno velika tek na vrlo visokom temperaturama (170–205 °C) [11,12]. Neki istraživači su probali da povećaju procenat iskorišćenja glicerola tako što se reakcija odvija u rastvaraču visoke temperature ključanja u kome su i glicerol i gliceridi rastvorljivi. Hildič i Rig preporučuju fenol ili krezol [5]. Na slici 1 prikazana je patentirana



Slika 1. Šematski prikaz odabranog postupka hemijske sinteze monoacilglicerola.

Figure 1. Schematic presentation of a selected chemical process for monoacylglycerols production.

šema postupka za izvođenje hemijske glicerolize u prisustvu *tert*-butanola kao rastvarača [13]. Međutim, još uvek nije nađeno dovoljno dobro rešenje koje bi povećalo efikasnost hemijskog postupka. Zbog velikih energetskih troškova, lošeg kvaliteta dobijenog proizvoda, odvijanja sporednih reakcija i brojnih drugih nedostataka sve više se ispituju enzimski postupci proizvodnje monoacilglicerola.

## ENZIMSKI POSTUPCI ZA DOBIJANJE MONOACILGLICEROLA

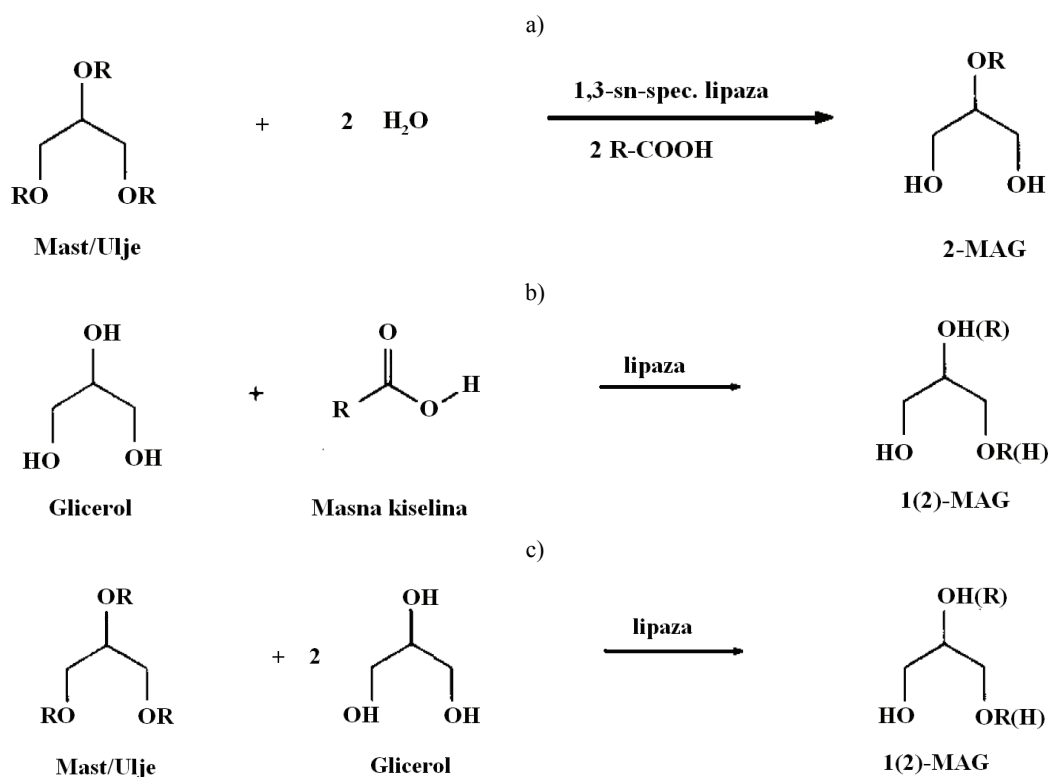
Enzimski postupci imaju značajnih prednosti u odnosu na hemijske. To su pre svega usmerenost reakcije, mogućnost korišćenja znatno nižih temperatura i dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta i u većem prinosu. Odvijanje procesa na nižim temperaturama dodatno omogućava sintezu termolabilnih monoacilglicerola. Sintezu monoacilglicerola pomoću lipaza se može ostvariti na tri načina: a) hidrolizom masti i ulja [14], b) esterifikacijom masnih kiselina i glicerola [15] i c) transesterifikacijom masti i ulja glicerolom (gliceroliza) [16,17]. Navedene reakcije su šematski prikazane na slici 2. Gliceroliza je naročito atraktivna jer se u reakciji koristi glicerol koji je nusprodukt drugih grana industrije, kao što je sinteza biodizela [18].

## Hidroliza

Pored nekih prednosti dobijanja MAG enzimskom hidrolizom triacilglicerola, kao što je mogućnost korišćenja prirodnih, obnovljivih sirovina (masti i ulja), osnovni nedostatak ovog načina proizvodnje su mali prinosi proizvoda i složenija kontrola i regulacija procesa zbog mogućnosti potpune hidrolize nastalih MAG do masnih kiselina i glicerola [19]. Dobijanje monoacilglicerola hidrolizom masti i ulja se, očito, najefikasnije izvodi primenom 1,3-*sn*-specifičnih lipaza (slika 2a). Međutim, čak i primenom poziciono specifičnih lipaza može doći do potpune hidrolize triacilglicerola zbog premeštanja acilnih ostataka iz 2-položaja u 1- ili 3-položaj u toku reakcije.

Enzimska hidroliza masti/ulja ispitana je sa različitim uljima i lipazama različitog porekla u nekoliko različitih reakcionih sistema kao što su dvofazni sistemi voda/ulje bez organskog rastvarača, dvofazni sistemi voda–rastvor supstrata u organskom rastvaraču, homogeni sistemi mikroemulzija i reverznih micela kao i membranski sistemi. Najveće brzine reakcija su postignute u sistemima reverznih micela i membranskim sistemima jer oni imaju značajno veću graničnu površinu u odnosu na druge sisteme [14,20].

Dokumentovan je veliki broj radova o hidrolizi masti i ulja pomoću lipaza. Tsai (Tsai) i Čang (Chang) su



Slika 2. Tipovi reakcija katalizovanih lipazama od značaja za dobijanje monoacilglicerola; a) hidroliza triglicerida, b) esterifikacija masnih kiselina i glicerola i c) gliceroliza triglicerida.

Figure 2. Lipase-catalyzed methods for the synthesis of monoacylglycerols; a) hydrolysis, b) esterification of fatty acids with glycerol and c) glycerolysis.

ispitivali kinetiku hidrolize maslinovog ulja u dvofaznom sistemu, dok su Kor (Khor) i saradnici ispitivali hidrolizu palminog ulja u prisustvu *n*-heksana [21,22]. U velikom broju ispitivanja kao supstrati su se koristila ulja dobijena iz semena uljarica [23,24]. Flenker (Flenker) i Spener (Spener) ricinusovo ulje su hidrolizovali koristeći 1,3-*sn*-specifičnu lipazu iz *Rhizopus arrhizus* [25]. Utvrđeno je da pH ima značajan uticaj na brzinu reakcije i prinos MAG i da je optimalni pH 7,5 pri čemu je ostvaren prinos od 23% MAG (pretežno monoricinolein) i 66% ricinooleinske kiseline nakon 3 h reakcije. Prinos MAG se mogao povećati do 65% kada se izvrši taloženje kiseline dodatkom soli usled pomeranja ravnoteže reakcije u pravcu nastajanja proizvoda.

MAG se mogu efikasno dobijati i u dvofaznom sistemu koji sadrži model triglicerid ( $C_{8:0}$ - $C_{14:0}$ ), *n*-heksan, alifatični alkohol (na primer 2-butanol) i vodeni rastvor pufera i 1,3-*sn*-specifične lipaze [26]. Navedeni dvofazni sistem voda/organski rastvarač omogućava biokatalizu lipofilnih supstrata jer obezbeđuje i polarnu fazu za rastvaranje enzima i nepolarnu fazu za rastvaranje supstrata. Međutim, kako se lipaze aktivne na granici faza, brzina reakcije je mala u ovim sistemima usled relativno male granične površine. Iako se pomerenjem ravnoteže reakcije ne utiče na brzinu reakcije i performanse ovih sistema, veći prinosi MAG se mogu postići ako se vrši esterifikacija obrazovanih masnih kiselina alifatičnim alkoholom u drugom stepenu reakcije. Prinosi MAG dobijenih na ovaj način iznosili su oko 70%. Ovaj način sinteze je naročito podesan za trigliceride koji sadrže ostatke masnih kiselina čija dužina lanca iznosi od C 8:0 do C 14:0 [26].

Enzimska hidroliza ulja za dobijanje MAG intenzivno se proučavala i u sistemima mikroemulzija i reverzних micela. Mikroemulzije su homogene, visoko transparentne tečne faze koje se sastoje od vodene faze, masne faze i emulgatora (površinski aktivne materije). Mikroemulzije se uspešno koriste kao reakcioni medijum za odvijanje lipolitičkih reakcija: eliminiše se problem nerastvorljivosti lipida, lipaza je dosta stabilna u mikroemulziji i može se izdvojiti i ponovo koristiti, međufazna površina je dovoljno razvijena i sadržaj vode se može menjati u širokom intervalu zahvaljujući čemu se može uticati na enzimsku aktivnost [27]. Holmberg (Holmberg) i Osterberg (Osterberg) ispitivali su uslove za dobijanje MAG enzimskom hidrolizom masti u sistemu mikroemulzija na bazi bis(2-etilheksil)natrijum-sulfosukcinata (AOT) u izooktanu [14]. Iako je pri optimalnim uslovima (1,3-*sn*-specifična lipaza iz *R. arrhizus*, molarni odnos pufera i PAM 1:12, pH 7,5, 35 °C, 3 h) ostvaren visok molski prinos monoacilglicerola (80%), za proizvodnju hrane i lekova mikroemulzije *n*-heksana i fosfolipida imaju veći značaj zbog velike toksičnosti izooktana i AOT-a [28].

Specifičnost lipaze je od presudnog značaja za dobijanje monoacilglicerola primenom reakcije hidrolize. Kako je potrebno da se odigra parcijalna hidroliza masti/ulja do monoacilglicerola, očekivano je da su 1,3-*sn*-specifične lipaze (*Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas fragi*, itd.) efikasniji biokatalizatori. Među najaktivnijim se pokazala lipaza iz *R. arrhizus* za koju je utvrđeno da je gotovo striktno poziciono specifična u nepolarnim organskim rastvaračima u kojima je brzina premeštanja acil grupa iz 2- u 1- i 3-položaj veoma spora [29]. Međutim, lipaze mogu pokazivati i druge vrste specifičnosti kao što je prema dužini i strukturi masnih kiselina (acil ostaci) i prema vrsti estera na koje deluju (tri-, di- ili monoacilgliceroli). Grupa autora je ispitivala katalitičko dejstvo nekoliko mikrobnih lipaza iz različitih izvora u model reakciji hidrolize palmine masti u sistemu reverzних micela. Dobijeni su interesantni rezultati koji su pokazali da se najveći prinosi monoacilglicerola u datom sistemu mogu postići sa lipazom iz *R. miehei* i sirovom lipazom iz *Penicillium cyclopium* [28,30,31]. Lipaza iz *Candida rugosa* je zbog pozicione nespecifičnosti i velikog afiniteta prema trigliceridima palminog ulja najefikasnije katalizovala potpunu hidrolizu do masnih kiselina i glicerola, ali su monoacilgliceroli obrazovani u tragovima [19,32-34]. Veliki uticaj na brzinu hidrolitičke reakcije i na prinos monoacilglicerola u mikroemulzijama i micelarnim rastvorima imali su vrsta organskog rastvarača i surfaktanta. Utvrđeno je da se dobijaju veći prinosi u mikroemulzijama organskih rastvarača veće hidrofobnosti i pri dodatku nejonskih površinski aktivnih materija (PAM) [14,28]. Jonske PAM, naročito katjonske, inaktiviraju enzim i pri malim koncentracijama, dok nejonske čak doprinose stabilnosti i aktivnosti enzima. Rastvaranjem enzima u mikroemulzijama izooktana pri dodatku lecitina kao emulgatora ne menjaju se osobine lipaze u odnosu na vodene rastvore (pH profil, temperaturni profil aktivnosti) i u ovom sistemu je moguće postići prinos monoacilglicerola od 62% pod optimalnim uslovima [28].

Savremena istraživanja su usmerena ka ispitivanju enzimске hidrolize masti/ulja u dvofaznim membranskim sistemima. Imobilizacija lipaza u porama membrane, koja ujedno razdvaja faze, predstavlja efikasno rešenje za procese koji se sastoje iz polarne (vodene) faze u kojoj je rastvoren jedan supstrat i enzim, i nepolarne (uljane) faze, u kojoj je rastvoren drugi supstrat. U ovim sistemima može se ostvariti velika međufazna površina bez upotrebe emulgatora i mešanja, omogućeno je odvijanje reakcije i separacije proizvoda u istoj jedinici, a enzim imobilisan na membrani se može koristiti više puta u šaržnom ili kontinualnom postupku [20,35]. Najveću primenu u hidrolizi ulja imaju kapilarni moduli sa membranama u obliku šupljih vlakana jer omogućavaju najveću kontaktnu površinu po jedinici zapremine mo-

dula i zbog male debljine membrana. Najvažniji faktori ovakvih sistema su pored parametara same reakcije, operativni režim rada reaktora: načini proticanja reakcije smeše kroz reaktor, načini imobilizacije i jačina vezivanja enzima na membrani, protoci faza i drugo. Knežević i saradnici su pokazali da u reakciji hidrolize palminog ulja u membranskom reaktoru brzina reakcije i prinos proizvoda u mnogome zavise od režima proticanja uljane i vodene faze, koji se mora optimizovati za svaki određen reakcioni sistem. Ukoliko je protok uljane faze, koja protiče kroz šuplja hidrofilna vlakna sa strane sa koje je imobilisana lipaza suviše mali, izražena su ograničenja uslovljena prenosom mase, a ukoliko je suviše veliki, dolazi do desorpcije enzima sa membrane [20]. Tan (Tan) i saradnici su projektovali novi membranski reaktor sa polivinil-alkohol/hitozan kompozitnom membranom za izvođenje reakcije hidrolize palminog ulja do monoacilglicerola. U početnim ispitivanjima optimizovali su postupak imobilizacije lipaze na kompozitnu membranu (uticaj pH, koncentracije enzima, metalnog jona i umrežavajućeg agensa) pri čemu su dobili aktivnu membranu standardne hidrolitičke aktivnosti 2,64 IU/cm<sup>2</sup>. Imobilisani membranski sistem se pokazao kao efikasan i stabilan i u realnom sistemu za hidrolizu palminog ulja i utvrđeno je da se sistem može koristiti za izvođenje najmanje devet uzastopnih šarži sa prinosima monoacilglicerola od 35–52% [37].

### Esterifikacija

Sinteza monoacilglicerola reakcijom esterifikacije masnih kiselina i glicerola omogućena je izolovanjem i konstrukcijom lipaza koje pokazuju veliku stabilnost u sistemima sa redukovanim sadržajem vode. Naime, kako se supstrati i u ovom slučaju ne mešaju, formira se dvofazni sistem u kome se reakcija odvija na granici faza. Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da su za ove reakcije uglavnom korišćena četiri tipa reakcionih sistema na laboratorijskom nivou i to: 1) skoro anhidrovani organski rastvarač koji rastvara oba supstrata, 2) dvofazni sistem bez rastvarača, 3) sistem mikroemulzija i reverznih micela i 4) dvofazni membranski reaktor.

U prvom slučaju bira se organski rastvarač koji dobro rastvara i glicerol i masnu kiselinu, tako da se dobija monofazni (homogeni) sistem. To su najčešće acetone, *n*-heksan, metilizobutil-eton i drugi. Pokazano je da aktivnost lipaza u ovim sistemima značajno zavisi od polarnosti rastvarača, ali i od prirode samog enzima. Bel (Bell) i saradnici su objavili visoku katalitičku aktivnost lipaze iz *R. arrhizus* u sintezi monoacilglicerola u acetoneu [38], dok su Miler (Miller) i saradnici pokazali da je lipaza iz *M. miehei* praktično neaktivna u acetoneu za istu reakciju [39]. Kako priroda samih supstrata (vrsta masne kiseline), može značajno da utiče na brzinu reakcije i da maskira uticaj samog biokatalizatora, obično se reakcije vršile na model sistemu – sintezi monooleil-

glicerola (MOG). Na datom model sistemu, utvrđeno je da lipaza G iz *Penicillium* sp. pokazuje značajno veću specifičnost i aktivnost pri sintezi MOG od komercijalne lipaze Lipozyme IM, kada su se obrazovali di- i trioleoilgliceroli kao glavni proizvodi [40].

Od značaja je naglasiti da u slučaju anhidrovanih organskih rastvarača kao reakcionih medijuma za odvijanje sinteze monoacilglicerola, struktura i polarnost organskog rastvarača predstavlja jedan od presudnih parametara procesa. Pastor (Pastor) [41] i Otero (Otero) sa saradnicima [42] na model sistemu ispitivali su uticaj polarnosti organskog rastvarača na brzinu sinteze MOG katalizovane lipazom iz *C. antarctica* i utvrdili da se u *n*-heptanu ne mogu dobiti prinosi MOG veći od 7,2%, dok se u acetoneu postiže prinos od 68% već posle 2 h. Iako nije postajala jasna zavisnost između brzine reakcije i kvantitativne mere polarnosti rastvarača (tzv. log *P*), jasno je da je biokatalizator bio aktivniji i selektivniji prema sintezi do monoacilglicerola u polarnijim organskim rastvaračima, kao što je acetoneitril. U nekim slučajevima istovremeno je korišćeno više organskih rastvarača. Monteiro i saradnici su izveli reakciju esterifikacije laurinske kiseline i glicerola pomoću komercijalne imobilisane 1,3-*sn*-specifične lipaze, Lipozyme IM, u sistemu sa smešom organskih rastvarača *n*-heksan/*tert*-butanol. Prisustvo rastvarača je dovelo do obrazovanja monofaznog sistema i pri molarnom odnosu glicerol:masna kiselina 5:1, prinos je iznosio 65% [43].

Kao i u prethodnom slučaju dobijanja monoacilglicerola hidrolizom masti i ulja, sistemi mikroemulzija i reverznih micela su jedni od najznačajnijih reakcionih medijuma za izvođenje reakcije esterifikacije masnih kiselina i glicerola. Reverzne micelle su vodene kapljice nanometarskih dimenzija koje su obuhvaćene slojem površinski aktivne materije (PAM) i dispergovane u organskom rastvaraču. Spontano se formiraju dodatkom PAM u nepolarne organske rastvarače koji sadrže male količine vode. To su homogeni sistemi koji su termodinamički stabilni, visoko uređeni, optički čisti i koji ne mrznu ni na temperaturama ispod nule. Reverzne micelle imaju mnogo veću graničnu površinu u odnosu na dvofazni sistem voda–organski rastvarač čime su postignute veće aktivnosti lipaza [34]. Inkapsulacijom glicerola u ove sisteme prevazilazi se problem slabe rastvorljivosti glicerola u organskom rastvaraču jer se glicerol rastvara u polarnom vodenom jezgru reverzne micelle. Hajes (Hayes) i Gulari (Gulari) prvi su uspeali da izvrše reakciju esterifikacije lipazom iz *R. delemar*, inkapsuliranjem glicerola u reverzne micelle i ostvarili prinos od 50–60% MAG [44]. Flečer (Fletcher) i saradnici su ostvarili veće prinose sa lipazom iz *Chromobacterium viscosum* što se objašnjava različitim specifičnostima ispitanih enzima kao i različitoj lokaciji enzima unutar micelle [45]. Tako, veliki broj lipaza, kao npr. lipaza iz *R. delemar*, ima više izražen hidrofilan karakter usled čega

su više u kontaktu sa vodenim jezgrom micela (model a na slici 3). Lipaza iz *Candida rugosa* je u interakciji sa zidom micela, jer u njen sastav ulaze aminokiseline sa većim udelom hidrofobnog karaktera (model b), dok su izrazito hidrofobne lipaze veoma retke (model c). Ove razlike u ponašanju različitih lipaza u sistemima reverzних micela potvrđuju neka istraživanja, koja su se odnosila na ispitivanje esterifikacije laurinske kiseline i glicerola koristeći lipazu iz *Pseudomonas cepacia* u reversnim micelama na bazi AOT-a [46]. Pokazano je i da stabilnost sistema varira u zavisnosti od porekla biokatalizatora. Tako je lipaza iz *C. viscosum* pokazala veliku stabilnost u AOT reverzним micelama, dok je u istom sistemu *R. delemar* imala malu stabilnost [44,45].

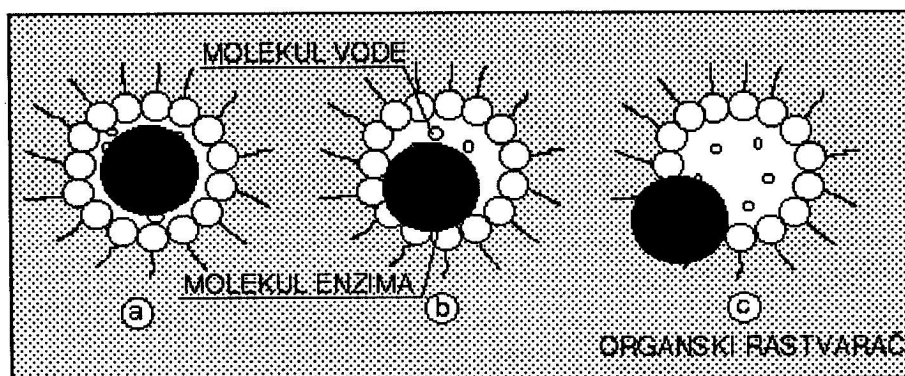
Primenom dvofaznih membranskih reaktora prevazilaze se nedostaci izvođenja lipolitičkih reakcija u mikroemulzijama kao što su primena emulgatora i potreba za intenzivnim mešanjem i nemogućnost reciklacije biokatalizatora. Njihova primena doprinosi ukupnim tehnološkim performansama i ekonomiji procesa jer se omogućava višekratna upotreba enzima u šaržnim procesima ili kontinualno izvođenje reakcije. Međutim, razvoj efikasnog imobilisanog membranskog sistema za sintezu monoacilglicerola je složen problem jer dolazi do spiranja enzima sa membrane i difuzionih otpora prenosu supstrata i proizvoda reakcije do/ili od membrane sa imobilisanim enzimom. Hok (Hoq) i saradnici su projektovali hidrofobni membranski sistem sa ravnim membranama od polipropilena, pri čemu je lipaza bila imobilisana sa strane preko koje protiče polarna voda/glicerol faza [47]. U datom sistemu, ostvaren je prinos monoacilglicerola od oko 90%, tako što je imobilisana velika količina lipaze u obliku aktivnog monomolekulskog sloja na membrani, kao i održavan nizak sadržaj vode (3–4%) u polarnoj fazi. Generalno, prednost hidrofobnih membrana je u tome što je moguće imobilisati velike količine lipaze običnom adsorpcijom zbog velikog afiniteta lipaza prema hidrofobnoj površini. Količina imobilisane lipaze je zavisila od vrste lipaze,

strukture i sastava membrane kao i uslova odvijanja adsorpcije i kretala se od 0,14 do 3,40 g m<sup>-2</sup> membrane [48]. Nedostatak ovih sistema je velika desorpcija lipaze u toku rada reaktora jer se enzim lako desorbuje u kontaktu sa polarnom fazom.

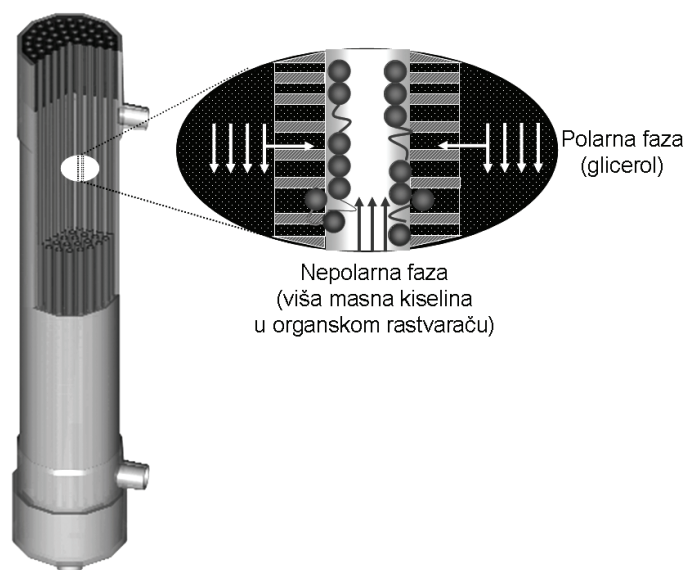
Pat (Padt) i saradnici su među prvima imobilisali lipazu iz *C. rugosa* na hidrofilnu membranu od regenerisane celuloze u obliku šupljih vlakana s ciljem izvođenja reakcije esterifikacije kaprinske kiseline i glicerola i postigli zadovoljavajuće prinose primenom malih količina imobilisanog enzima [49]. Na slici 4 šematski je prikazan mehanizam odvijanja reakcije esterifikacije viših masnih kiselina i glicerola lipazom imobilisanom na hidrofilnim vlaknima. Velika prednost hidrofobnih membranskih reaktora u odnosu na hidrofobne je veća stabilnost sistema zbog smanjene desorpcije enzima sa membrane. Naime, enzim je imobilisan sa strane preko koje protiče nepolarna faza. Još jedna prednost hidrofobnih membrana je veća postojanost na visoke pritiske (granični transmembranski pritisak >10<sup>5</sup> N m<sup>-2</sup>) tako da teže dolazi do prodora jedne faze u drugu i njihovog mešanja. Nedostatak membranskih procesa sa hidrofilnim membranama je mala količina imobilisanog enzima i to što se enzim nanosi na membranu mehanički pod pritiskom, najčešće ultrafiltracijom.

Reakcija esterifikacije masnih kiselina i glicerola je povratna reakcija hidrolize. Zbog toga je važno da uslovi reakcije budu podešeni tako da enzimi vrše reakciju sinteze, pre nego reakciju hidrolize, odnosno neophodno je održati mali sadržaj vode i nisku aktivnost vode u sistemu [50,51]. Takođe, problem u ovoj reakciji je i slaba rastvorljivost glicerola u organskom rastvaraču. U tabeli 1 dat je pregled različitih metoda za dobijanje visokog prinosa monoglicerida i sprečavanje reakcije hidrolize, kao što su dodavanje molekulskih sita ili odigravanje reakcije pod sniženim pritiskom [39,52,53].

Jamaguči i Mase (Yamaguchi i Mase) [52] ostvarili su velike prinose monoacilglicerola korišćenjem lipaze iz *Penicillium camemberti* u prisustvu molekulskih sita



Slika 3. Šematski prikaz molekula lipaze u reverznoj miceli; a) hidrofилна lipaza, b) površinski aktivna lipaza i c) hidrofobna lipaza.  
Figure 3. Schematic presentation of a lipase molecule in reverse micelle; a) hydrophylic lipase, b) surface active lipase and c) hydrophobic lipase.



Slika 4. Šematski prikaz odigravanja reakcije esterifikacije viših masnih kiselina glicerolom sa lipazom imobilisanom na hidrofilnim šupljim vlaknima u membranskom reaktoru.

Figure 4. Schematic presentation of the esterification of fatty acids with glycerols by using an lipase immobilized onto hydrophilic hollow fibers in a membrane reactor.

Tabela 1. Metode sinteze monoacilglicerola u reakcijama esterifikacije

Table 1. The methods of monoacylglycerols synthesis in the esterification reaction

Metoda	Princip	Literatura
Dodavanje molekulskih sita	Uklanjanje vode	[52]
Snižen pritisak	Uklanjanje vode	[39]
Adsorpcija glicerola na čvrste nosače	Pomeranje ravnoteže, povećana selektivost	[55]
Adsorpcija monoacilglicerola na kolone	Pomeranje ravnoteže, povećana selektivost	[53]
Dodatak rastvarača <i>n</i> -heksan/ <i>tert</i> -butanol	Povećana rastvorljivost glicerola	[43]

koji imaju funkciju da uklanjaju vodu iz sistema. Pod optimalnim uslovima i pri stepenu konverzije od 90%, više od 70% nastalog proizvoda su monoacilgliceroli. Takođe je uočeno da dodatak molekulskih sita favorizuje i prevođenje diglicerida u monogliceride. Problem male rastvorljivosti glicerola u nepolarnim organskim rastvaračima je rešen prethodnom adsorpcijom glicerola na čvrste nosače (silika gel, celit) [3,54]. Reakcioni sistem se sastoji iz glicerola, u obliku suvog praha, koji je suspendovan u organskom rastvaraču (*tert*-butilmetil-etar, dietiletar-heksan), acil-donora i 1,3-*sn*-specifične lipaze (*R. delemar*, *R. miehei* i *C. viscosum*). Nakon završene reakcije, enzim i čvrsti nosač se uklanjaju filtracijom dok produkti esterifikacije ostaju u rastvoru. Pod optimalnim uslovima, stepen konverzije iznosi 70% [55]. Da bi se sprečilo naknadno acilovanje, koje može da se desi u reakciji esterifikacije sa čistim glicerolom, nekoliko autora je koristila modifikovani glicerol. Ovaj način sinteze je pogodan i za dobijanje monoglicerida specifične strukture. Reakcija se izvodi tako što su dve od tri hidroksilne grupe u molekulu glicerola blokirane. Nakon esterifikacije, blokirane grupe se uklanjaju pri čemu se dobija čisti monoacilglicerol [56–58]. Za uklanjanje

blokirane grupe korišćene su različite metode, od blagih reakcija hidrolize sa bornom kiselinom u 2-metoksietanolu ili jodom u metanolu, do reakcija sa koncentrovanim hlorovodoničnom kiselinom [56,57]. Maksimalna konverzija oleinske kiseline esterifikacijom sa 1,2-*O*-*rac*-isopropildien-*sn*-glicerolom, ostvarena je u sistemu sa *n*-heptanom i *n*-dodekanom. U ovoj reakciji, gde je katalizator *Pseudomonas cepacia*, ostvaren je prinos od 84% [59].

U literaturi postoje različiti podaci o raznovrsnosti lipaza koje se koriste kao katalizatori u reakciji esterifikacije. Utvrđeno je da lipaze iz *Aspergillus niger* ili *Rhizopus delemar* esterifikuju oleinsku kiselinu isključivo na *sn*-1 ili *sn*-3 poziciji glicerola, dok lipaze iz *Geotrichum candidum* i *Penicillium cyclopium* esterifikuju samo više masne kiseline pri čemu se esterifikovanje vrši nasumično [60]. Ispitan je i uticaj dužine lanca masnih kiselina na reakciju esterifikacije. Veći prinos monoglicerida je ostvaren sa masnim kiselinama kraćeg lanca u reakciji sa polarnim rastvaračem, dok je veći prinos di- i tri- glicerida ostvaren sa masnim kiselinama dužeg lanca u reakciji sa nepolarnim organskim rastvaračima [61].

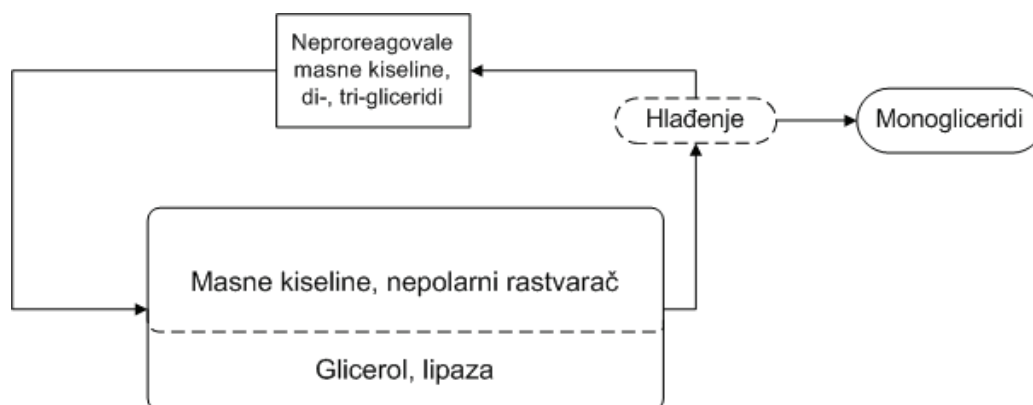
Metode za dobijanje monoglicerida esterifikacijom su opisane u brojnim patentima [62,63]. Navedeni i ostali postupci esterifikacije, imaju nedostatak što se kao polazne sirovine koriste masne kiseline i glicerol koji predstavljaju skupe supstance. Šroder i Oba (Shroder i Oba) patentirali su kontinualni postupak sinteze monoglicerida, gde se iz sistema kontinualno izvodi deo reakcione smeše, koja se zatim hladi, uklanja se istaloženi monoglicerid, a preostali rastvor se koji sadrži ne-proreagovale masne kiseline i malu količinu di- i triglicerida kontinualno vraća u reakcioni sistem (slika 5) [64]. Omer i saradnici [58] ostvarili su visoke prinose monoacilglicerola reakcijom esterifikacije isopropildien glicerola i masnih kiselina, ali je i ovaj postupak ocenjen kao skup jer zahteva dva hemijska postupka: kondenzaciju i hidrolizu.

### Gliceroliza

Reakcijom enzimske glicerolize triacilglicerola, teoretski je moguće ostvariti veliki prinos monoacilglicerola. Objavljeno je puno radova o glicerolizi monoacilglicerola pomoću lipaza i to u sistemu sa [6,10,65] ili bez organskog rastvarača [66–68], sa imobilisanim ili slobodnim enzimom [69–71], kao i u sistemu sa natkritičnim fluidom [72–74]. U tabeli 2 dat je pregled uslova reakcije glicerolize sa lipazama različitog porekla. Enzimski katalizovana gliceroliza postaje sve atraktivnija za sintezu monoglicerida, zbog znatno blažih reakcionih uslova, niže temperature i boljeg finalnog proizvoda u poređenju sa hemijskom. Međutim, velika mana enzimske glicerolize je što se reakcioni sistem sastoji iz tri faze: hidrofobne uljane faze, hidrofilne faze glicerola i čvrste faze enzima. Kako enzimi imaju hidrofilni karakter, glicerol se vezuje za čestice enzima i otežava pristup molekulu ulja, što za posledicu ima nizak prinos monoglicerida [6]. Zbog toga je u u slučaju odvijanja glicerolize neophodno uvesti organske rastvarače u reakcioni sistem kako bi se povećala slaba rastvorljivost hidrofobnih jedinjenja. Ipak, upotreba organskih rastvarača

može da dovede do neželjenih promena na molekulu enzima što zavisi, kako od upotrebljenog rastvarača, tako i od korišćenog enzima. Kevtong i Kitikun (Kaewthong i H-Kittikun) koristili su smešu aceton/izooktan (3:1) za glicerolizu palminog ulja [10]. Druga grupa istraživača je koristila aceton kao organski rastvarač za alkoholiozu ribljeg ulja pomoću lipaze PS-C [75], dok su Pavongrat (Pawongrat) i saradnici kao najbolji rastvarač izdvojili *tert*-butil-metil-etar [9]. Damstrup (Damstrup) i saradnici su ispitivali uticaj niza rastvarača na glicerolizu suncokretovog ulja pomoću lipaze Novozym 435 [6]. Kao parametar uticaja rastvarača su koristili  $\log P$ , logaritamski koeficijent raspodele datog organskog rastvarača u dvofaznom sistemu *n*-oktanol/voda. Visoke vrednosti  $\log P$  karakterišu nepolarna jedinjenja, dok niske ili negativne vrednosti ukazuju na izrazito polarna jedinjenja. Ispitivanja su pokazala da su sa hidrofilnim rastvaračima (kao što su izopropanol i etanol, sa  $\log P$  vrednostima 0,05 i –0,30) ostvareni veći prinosi monoacilglicerola, nego sa hidrofobnim rastvaračima (*n*-heptan, *n*-heksan, izooktan;  $\log P$  vrednosti 4,5; 4,0; 5,15, redom). Ipak, najbolji prinosi su ostvareni kada su se kao rastvarači koristili *tert*-butanol i *tert*-pentanol. I druga ispitivanja su dala slične rezultate [7,76]. Utvrđeno je da ne samo polarnost, nego i funkcionalna grupa rastvarača ima veliku ulogu u reakciji glicerolize. Optimalno je da rastvarač ima i hidrofilne i hidrofobne karakteristike kako bi kao rastvarač bio pogodan i za ulje i za glicerol.

Pokazano je da se odlični rezultati u reakciji glicerolize masti i ulja mogu postići primenom određenog temperaturnog režima koji se zasniva na postepenom snižavanju temperature reakcione smeše i njenim prevođenjem u čvrsto stanje (eng. *solid-phase glycerolysis*) [77]. Početni dvofazni sistem koji se sastoji iz faze ulja i faze glicerola u kojoj je suspendovan enzim zagreje se na određenu temperaturu (25–50 °C) i održava na toj temperaturi samo nekoliko početnih časova reakcije, a zatim se ohladi na temperaturu ispod kritične vrednosti koja je karakteristična za određenu masti/ili ulje. Na



Slika 5. Šema kontinualnog enzimskog postupka sinteze monoacilglicerola.

Figure 5. Schematic presentation of a continuous enzymatic process for monoacylglycerols production.



Tabela 2. Pregled uslova reakcije glicerolize sa lipazama različitog porekla  
Table 2. Review of reaction conditions for lipase-catalyzed glycerolysis

Lipaza	Substrat	Rastvarač	Literatura
<i>Candida antarctica</i>	Suncokretovo ulje	<i>tert</i> -butanol, <i>tert</i> -pentanol, aceton, heksan, izooktan,	[6]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tuna ulje	<i>tert</i> -butil-metil-etar	[9]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Maslinovo ulje, palmino ulje	Ne	[65]
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Candida rugosa</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i>	Triolein	Ne	[3]
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Pseudomonas pseudoalkali</i>	Maslinovo ulje	Ne	[78]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	1,3-palmitin-2-olein	Ne	[69]
<i>Candida antarctica</i>	Maslinovo ulje	Ne	[72]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Triolein	Aceton/izooktan	[9,81]
<i>Candida antarctica</i> , <i>Mucor miehei</i>	Maslinovo ulje	Ne	[66]
<i>Candida antarctica</i>	Suncokretovo ulje	<i>tert</i> -pentanol	[74]
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Buterno ulje	Ne	[64]
<i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Porcine pancreas</i>	Palmino ulje	Ne	[16]
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida rugosa</i> , <i>Penicillium camembertii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Humicola lanuginosa</i>	Palmino ulje, govedji loj	Ne	[79]
<i>Mucor miehei</i>	Ulje uljane repice	izooktan	[78]
<i>Rhizopus delemar</i>	Palmino ulje	<i>n</i> -heksan, <i>n</i> -oktan, izooktan	[13]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Mucor miehei</i>	Palmino ulje, kokosovo ulje, kukuruzno ulje, ulje uljane repice	Ne	[77]
<i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Rhizopus delemar</i>	Triolein	Ne	[75]

kritičnoj temperaturi dolazi do očvršćavanja reakcione smeše i izdvajanja nastalih monoglicerida kristalizacijom što prouzrokuje pomeranje ravnoteže u pravcu njihovog nastajanja. Na taj način, zahvaljujući osobini da nastali monogliceridi imaju višu temperaturu topljenja od početnih triglicerida, moguće je ostvariti visoke prinose [78]. Tako je glicerolizom kukuruznog ulja pomoću lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* u diskontinualnom sistemu, postignut prinos od 20,4% [79]. Povećanje prinosa je postignuto na taj način što je reakcija prvo izvođena u tečnom emulzionom sistemu, zatim hlađena do očvršćavanja smeše i kristalizacije nastalih monoglicerida, pri čemu je ostvaren prinos iznosio 70–99%. Najvažniji parametar ovog procesa je reakciona temperatura, odnosno „kritična temperatura“ koja oštro razdvaja oblast visokog prinosa od oblasti niskog prinosa monoacilglicerola. Vrednost kritične temperature,  $T_c$  zavisi od vrste triglicerida. Za masti sa visokom temperaturom topljenja  $T_c$  iznosi 35–45 °C, dok za ulja vrednost  $T_c$  je između 5–10 °C [78,80]. Rosu (Rosu) i saradnici su izveli glicerolizu maslinovog ulja pomoću imobilisane lipaze iz *Pseudomonas* sp. pri čemu je početna temperatura reakcione smeše bila 25 °C. Nakon sat vremena, reakciona temperatura je snižena na 10 °C, a na-

kon 23 h na 5 °C. Nakon 72 h reakcije, prinos monoacilglicerola je iznosio 90% [81]. Imobilisani enzim je pokazao i veliku stabilnost pri uzastopnom korišćenju, tako da se mogao koristiti pet puta bez gubitka aktivnosti. Ostali parametri od kojih zavisi prinos monoglicerida su sadržaj vode, molarni odnos trigliceridi/glicerol i količina i vrsta lipaze. Aktivnost i stabilnost lipaza različitog porekla je analizirana na modelu trioleina i utvrđeno je da su bakterijske lipaze znatno stabilnije, dok su neke gljivične lipaze pokazale slabu aktivnost [78]. Međutim, iako je glicerolizom u čvrstom stanju moguće ostvariti visoke prinose ona i dalje nije prihvatljiva za industrijsku proizvodnju jer se javlja problem uklanjanja monoglicerida iz reaktora i reciklacija neproreagovalog materijala [82].

Razvijeni su i brojni sistemi za kontinualnu glicerolizu kao što su membranski bioreaktori i reaktori sa pakovanim slojem. Kevtong i saradnici su ispitivali devet komercijalnih lipaza za glicerolizu u šaržnom sistemu i kao najbolja od njih se pokazala *Pseudomonas* sp. imobilisana na Accurel EP100. Prinos monoacilglicerola u sistemu bez rastvarača nakon 24h je iznosio 20,74%. U reaktoru sa pakovnim slojem u istom sistemu prinos je, nakon 96 h, iznosio samo 14,1% [16]. Uvođe-

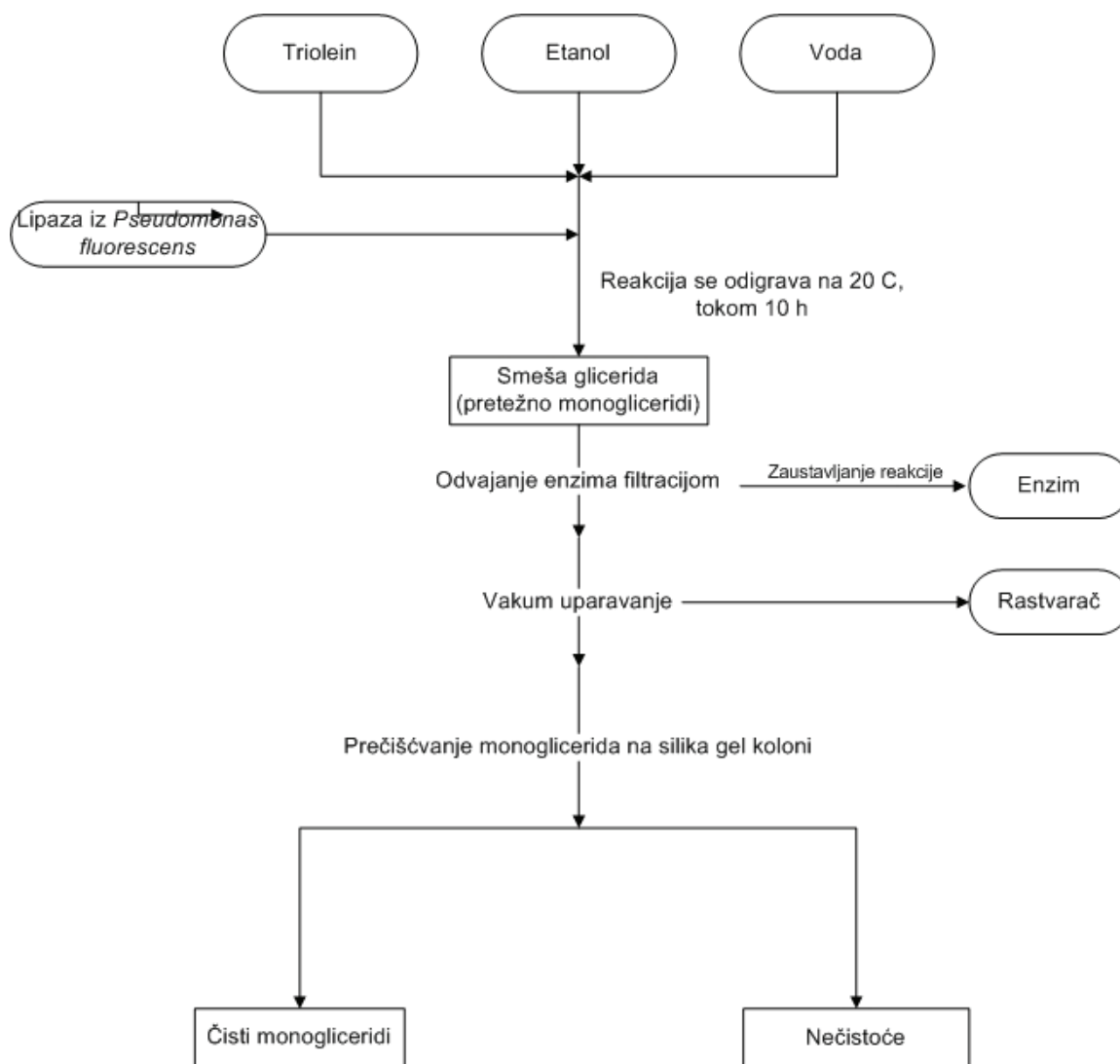
njem rastvarača u ovakav sistem (aceton/izooktan) prinos je u šaržnom sistemu iznosio 56% za 24 h, dok je u reaktoru sa pakovanim slojem prinos monoacilglicerola iznosio 70,1% nakon 24 h, pri čemu je produktivnost povećana 11 puta u odnosu na šaržni reaktor [83].

Mnogi drugi postupci za dobijanje monoacilglicerola alkoholizom masti i ulja su opisane u literaturi. Jedan od patentiranih postupaka izvođenja reakcije enzimske transesterifikacije je prikazan na slici 6. Farmaceutska kompanija „Amano“ je komercijalizovala postupak,

kontinualnim procesima još uvek nisu u potpunosti rešene.

## ZAKLJUČAK

Monoacilgliceroli su monoestri alkohola glicerola i masnih kiselina, a zahvaljujući sadržaju i lipofilnih (masne kiseline) i hidrofilnih (hidroksilne) grupa poseduju značajnu površinsku aktivnost. Na ovoj osobini se zasniva njihova velika primena u prehrambenoj i pekar-



Slika 6. Šema postupka izvođenja enzimske sinteze monoacilglicerola.  
Figure 6. Schematic presentation of enzymatic production of monoglycerides.

ali je on vrlo brzo ocenjen kao skup i još uvek nekonkurentan hemijskom postupku. Iako enzimska reakcija glicerolize ima brojnih prednosti u poređenju sa hemijskom, ali i sa enzimskom hidrolizom i esterifikacijom, stabilnost biokatalizatora u prisustvu organskog rastvarača i glicerola kao i njegova reciklacija u šaržnim i

skoj industriji, kao i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Konvencionalni hemijski načini proizvodnje monoacilglicerola imaju značajnih nedostataka zbog primene visokih temperatura koje dovode do odvijanja sporednih reakcija, smanjenog prinosa i kvaliteta proizvoda. Alternativa hemijskoj sintezi su enzimski postupci koji imaju značajnih prednosti. Enzimska sinteza mono-

acilglicerola pomoću lipaza se može ostvariti na tri načina: hidrolizom masti i ulja, esterifikacijom masnih kiselina i glicerola i transesterifikacijom triglicerida i glicerola (gliceroliza), kao jedan od najperspektivnijih načina njihovog dobijanja. Iako enzimski postupci još uvek nisu zaživeli na industrijskom nivou, prednosti takve proizvodnje kao i sve veći interes za prirodnim proizvodima, koji se dobijaju biotehnoškim putem, svakako će uticati na sve veće ispitivanje i istraživanje ovakvog načina sinteze.

### 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] P. Modić, Upotreba prehrambenih aditiva, Poljo-knjiga, Beograd, 2001.
- [2] D. Swern, Industrijski proizvodi ulja i masti po Baileyju, Nakladni Zavod Znanje, Zagreb, 1972.
- [3] U. Bornscheuer, Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols, *Enzym. Microb. Technol.* **17** (1995) 578–586.
- [4] L. Freitas, T. Bueno, V.H. Perez, H.F. De Castro, Monoacylglycerides: Production by enzymatic route and applications, *Quim. Nova* **31** (2008) 1514–1521.
- [5] T.P. Hilditch, J.G. Rigg, U.S. Patent 2,073,797, 1937.
- [6] M.L. Damstrup, T. Jensen, F.V. Sparso, S.Z. Kiil, A.D. Jensen, X.Xu, Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82** (2005) 559–564.
- [7] T. Yang, M. Rebsdorf, U. Engelrud, X. Xu, Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system, *J. Agr. Food Chem.* **53** (2005) 1475–1481.
- [8] A. Hans-Jurgen, Starch and Other Polysaccharides to Surfactants, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, B. Elvers, S. Hawkins, W. Russey (Eds.), 5<sup>th</sup> ed., Vol. A25, Wiley VCH, Weinheim, 1994.
- [9] R. Pawongrat, X. Xu, A.H. Kittikun, Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK, *Food Chem.* **104** (2007) 251–258.
- [10] W. Kaewthong, A.H. Kittikun, Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.* **35** (2004) 218–222.
- [11] A. Edeler, A.S. Richardson (Practer & Gamble), U.S. Patent 2,206,167, 1940.
- [12] C.W. Christensen (Armour Co), U.S. Patent 2,022 (1935) 493
- [13] Y.M. Choo, S.F. Cheng, A.N. Ma, Y. Basiron U.S. Patent 7,531,677, 2009.
- [14] K. Holmberg, E. Osterberg, Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (1988) 1544–1548.
- [15] R. Schuch, K.D. Mukherjee, Lipase-catalyzed reactions of fatty acids with glycerol and acylglycerols, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30** (1989) 332–336.
- [16] W. Kaewthong, S. Sirisansaneeyakul, P. Prasertsan, A.H. Kittikun, Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase, *Process Biochem.* **40** (2005) 1525–1530.
- [17] K. Holmberg, B. Lasse, M.B. Stark, Enzymatic glycerolysis of a triglyceride in aqueous and nonaqueous microemulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66** (1989) 1796–1800.
- [18] S. Al-Zuhair, Production of biodiesel: possibilities and challenges, *Biofuels, Bioprod. Biorefin.* **1** (2007) 57–66.
- [19] Z. Knežević, S. Šiler-Marinković, Lj. Mojović, Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil in lecithin/isooctane reversed micelles, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49** (1998) 267–271.
- [20] Z. Knežević, G. Kukić, M. Vuković, B. Bugarski, B. Obradović, Operating regime of a biphasic oil/aqueous hollow-fiber reactor with immobilized lipase for oil hydrolysis, *Process Biochem.* **39** (2004) 1377–1385.
- [21] S.W. Tsai, C.S. Chang, Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of lipids in biphasic organic–aqueous system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **57** (1993) 147–154.
- [22] H.T. Khor, N.H. Tan, C.L. Chua, Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63** (1986) 538–540.
- [23] K.D. Mukherjee, I. Kiewitt, Changes in fatty acid composition of lipid classes in developing mustard seed, *Phytochemistry* **23** (1984) 349–352.
- [24] K.D. Mukherjee, I. Kiewitt, Lipids containing very long chain monounsaturated acyl moieties in seeds of *lunaria annua*, *Phytochemistry* **25** (1986) 401–404.
- [25] J. Flenker, F. Spener, DECHEMA-Biotechnology Conference **4** (1990) 139–142.
- [26] A.W. Mayur, G.D. Hiler, M. El-Nokaly, *ACS Symp.* **448** (1991) 51–61.
- [27] H. Stamatis, A. Xenakis, F.N. Kolisis, Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases, *Biotechnol. Adv.* **17** (1999) 293–318.
- [28] S. Šiler-Marinković, Lj. Mojović, Z. Knežević, N. Antonović, Enzymatic production of monoacylglycerols in microemulsions. *J. Serb. Chem. Soc.* **60** (1995) 567–574.
- [29] M. Berger, M.P. Scheider, Regioselectivity of lipases in organic solvents, *Biotechnol. Lett.* **13** (1991) 333–338.
- [30] Z. Knežević, B. Milić, Lj. Mojović, Monoacylglycerol production by lipase from *Penicillium cyclopium* BG-AL1, DECHEMA – The World Congress on Biotechnology, Berlin, Book of abstracts, Vol. 4, 2000, p. 453.
- [31] L. Mojović, Z. Knežević, D. Jovanović, A. Banina, Production of monoacylglycerols by lipase from *Penicillium cyclopium* BG-AL1, *Hem. Ind.* **53** (1999) 155–159.
- [32] Z. Knežević, S. Bobić, A. Milutinović, B. Obradović, L. Mojović, B. Bugarski, Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system, *Process Biochem.* **38** (2002) 313–318.
- [33] Z. Knežević, L. Mojović, B. Adnadjević, Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on

- zeolite type Y, *Enzyme Microb. Technol.* **22** (1998) 275–280.
- [34] Z. Knežević, Dobijanje monoacilglicerola enzimskom hidrolizom palmine masti, Magistarski rad, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, 1998.
- [35] W. Pronk, P.J.A.M. Kerkhof, C. van Helden, K. van't Riet, The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **32** (1988) 512–518.
- [36] L. Giorno, E. Drioli, Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, Review, *TIBTECH* **18** (2000) 339–349.
- [37] T. Tan, F. Wang, H. Zhang, Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride, *J. Mol. Catal. B – Enzym.* **18** (2002) 325–331.
- [38] G. Bell, J.A. Blain, J.D.E. Patterson, C.E.L. Shaw, R. Todd. Ester and glyceride synthesis by *Rhizopus arrhizus* mycelia, *FEMS Microbiol. Lett.* **3** (1978) 223–225.
- [39] C. Miller, H. Austin, L. Posorske, J. Gonzales, Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65** (1988) 927–931.
- [40] R. Schuch, K.D. Mukherjee, Lipase-catalyzed reaction of fatty acids with glycerol and acylglycerols, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30** (1989) 332–336.
- [41] E. Pastor, A. Ballesteros, F.J. Plou, C. Otero, Enzymatic synthesis of oleins in organic media, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **750** (1995) 242–245.
- [42] C. Otero, E. Pastor, M.L. Rua, A. Ballesteros, Hydrolysis and synthesis of butyrylglycerols by lipases, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **613** (1990) 523–528.
- [43] J.B. Monteiro, M.G. Nascimento, J.L. Ninow, Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system, *Biotechnol. Lett.* **25** (2003) 641–644.
- [44] D.G. Hayes, E. Gulari, 1-Monoglyceride production from lipase-catalyzed esterification glycerol and fatty acid in reverse micelles, *Biotechnol. Bioeng.* **38** (1991) 507–517.
- [45] P.D.I. Fletcher, R.B. Freedman, B.H. Robinson, G.D. Res, R. Schomacker, Lipase catalyzed ester synthesis in oil-continuous microemulsions, *Biochem. Biophys. Acta* **912** (1987) 278–282.
- [46] U. Bornscheuer, H. Stamatis, A. Xenakis, T. Yamane, F.N. Kolisis, A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides, *Biotech. Lett.* **16** (1994) 697–702.
- [47] M.M. Hoq, H. Tagami, T. Yamane, S. Shimidzu, Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor, *Agric. Biol. Chem.* **49** (1985) 335–342.
- [48] Z. Knežević, Imobilisane lipaze kao biokatalizatori, Biblioteka Disertatio, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2004.
- [49] A. Van der Padt, J.J.W. Sewalt, S.M.I. Agoston, K. Van't Riet, *Candida rugosa* lipase stability during acylglycerol synthesis, *Enzyme Microb. Technol.* **14** (1992) 805–812.
- [50] M. Goldberg, D. Thomas, M.D. Legoy, Water activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic (liquid/solid) media, *Enzyme Microb. Technol.* **12** (1990) 976–981.
- [51] S.A. Khaan, P.J. Halling, Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymic catalysis, *Enzyme Microb. Technol.* **12** (1990) 453–458.
- [52] S. Yamaguchi, T. Mase, High-Yield Synthesis of Monoglyceride by Mono- and Diacylglycerol Lipase from *Penicillium camembertii* U-150, *J. Ferment. Bioeng.* **72** (1991) 162–167.
- [53] A. Van der Padt, J.T.F. Keurentjes, J.J.W. Sewalt, E.M. van Dam, L.J. van Dorp, K. Van't Riet, Enzymatic synthesis of monoglycerides in a membrane bioreactor with an in-line adsorption column, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (1992) 748–754.
- [54] J.B. Kristensen, X. Xu, H. Mu, Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercial available lipases, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82** (2005) 329–334.
- [55] M. Berger, M.P. Schneider, Enzymatic esterification of glycerol II. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1 (3)-*rac*-monoacylglycerols, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (1992) 961–965.
- [56] C.C. Akoh, Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride, *Biotech. Lett.* **15** (1993) 949–954.
- [57] S. Pecnik, Z. Knez, Enzymatic fatty esters synthesis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69** (1992) 261–265.
- [58] I.C. Omar, H. Saeki, N. Nishio, S. Nagai, Synthesis of acetone glycerol acyl esters by immobilized lipase of *Mucor miehei*, *Biotech. Lett.* **11** (1989) 161–166.
- [59] R. Hess, U. Bornscheuer, A. Capewell, T. Scheper, Lipase-catalyzed synthesis of monostearoylglycerol in organic solvents from 1,2-*O*-isopropylidene glycerol, *Enzyme Microb. Technol.* **17** (1995) 725–728.
- [60] Y. Tsujisaka, S. Okumura, M. Iwai, Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase, *Biochim. Biophys. Acta* **489** (1977) 415–422.
- [61] A.E.M. Janssen, A. Van der Padt, K. Van't Riet, Solvent effects on lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty acids, *Biotechnol. Bioeng.* **42** (1993) 953–962.
- [62] A. Zaks, A.T. Gross, U.S. Patent 5,315,927, 1994.
- [63] A. Zaks, A.T. Gross, U.S. Patent 5,935,828, 1999.
- [64] R. Shroder, K. Oba, U.S. Patent 5,153,126, 1992.
- [65] M.L. Damstrup, J. Abildskov, S.Z. Kiil, A.D. Jensen, F.V. Sparso, X. Xu, Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 7113–7119.
- [66] H.S. Garcia, B. Yang, K.L. Parkin, Continuous reactor for enzymic glycerolysis of butteroil in the absence of solvent, *Food Res. Int.* **28** (1996) 605–609.
- [67] H. Ghamugi, N. Miled, A. Rebai, M. Karra-Chaabouni, Y. Gargouri, Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology, *Enzyme Microb. Technol.* **39** (2006) 717–723.
- [68] A. Coteron, M. Martinez, J. Aracil, Reaction of olive oil and glycerol over immobilized lipases, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (1998) 657–660.

- [69] M. Tuter, H.A. Aksoy, Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of glycerolysis products, *Biotechnol. Lett.* **22** (2000) 31–34.
- [70] H. Nouredini, S.E. Harmeier, Enzymatic glycerolysis of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75** (1998) 1359–1365.
- [71] T. Tan, C. Yin, The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1,3 position specific lipase from *Rhizopus arrizus*, *Biochem. Eng. J.* **25** (2005) 39–45.
- [72] R. Kumar, S. Madras, J. Modak, Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide, *Ing. Eng. Chem. Res.* **43** (2004) 1568–1573.
- [73] J.V. Oliveira, D. Oliveira, Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>, *Ing. Eng. Chem. Res.* **39** (2000) 4450–4454.
- [74] A. Esmelindro, K. Fiametti, G. Ceni, M. Corazza, H. Treichel, D. De Oliveira V. Oliviera, Lipase-catalyzed production of monoglycerides in compresses propane and AOT surfactant, *J. Supercrit. Fluid.* **47** (2008) 64–69.
- [75] S. Wongsakul, P. Prasertsan, U.T. Bornscheuer, A. H-Kittikun, Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **105** (2003) 68–73.
- [76] M.L. Damstrup, T. Jensen, F. V. Sparso, S.Z. Kiil, A.D. Jensen, X. Xu, Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in tert-pentanol: Process optimization by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83** (2006) 27–33.
- [77] U.T. Bornscheuer, T. Yamane, Activity and stability of lipase in the solid-phase glycerolysis of triolein, *Enzyme Microb. Technol.* **16** (1994) 864–869.
- [78] G.P. McNeill, S. Shimizu, T. Yamane, High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (1991) 1–5.
- [79] T. Yamane, M.M. Hoq, S. Itoh, S. Shimizu, Glycerolysis of fat by microbial lipase, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* **35** (1986) 625–631.
- [80] G.P. McNeill, T. Yamane, Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (1991) 5–10.
- [81] R. Rosu, Y. Uozaki, Y. Iwasaki, T. Yamane, Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74** (1997) 445–450.
- [82] I. Elfman-Borjesson, M. Haarrod, Synthesis of monoglycerides by glycerolysis of rapeseed oil using immobilized lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** (1999) 701–707.
- [83] A. H-Kittikun, W. Kaewthong, B. Cheirsilp, Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipases PS, *Biochem. Eng. J.* **40** (2008) 116–120.

**SUMMARY****SYNTHESIS OF MONOACYLGLYCEROLS BY ENZYMATIC METHODS**

Milena R. Bradić<sup>1</sup>, Nevena D. Ognjanović<sup>1</sup>, Dejan I. Bezbradica<sup>1</sup>, Sanja Ž. Grbavčić<sup>1</sup>, Nataša Avramović<sup>2</sup>, Dušan Ž. Mijin<sup>1</sup>, Zorica D. Knežević-Jugović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Institute for Chemistry, School of Medicine, Višegradska 26, Belgrade, Serbia

(Review paper)

Monoacylglycerols are non-ionic surfactants widely used in the food industry. They are also important in cosmetic and pharmaceutical industries as drug carriers and for consistency improvements in creams and lotions. The current process for their production is based on the glycerolysis of natural fats and oils in the presence of inorganic catalysts at temperatures higher than 220 °C. The major drawbacks of this process include high-energy consumption, low yield, and poor product quality. The use of lipases for monoacylglycerols production offers environmental advantages and a reduction in energy consumption. Besides, the same surfactants prepared by the enzymatic synthesis may be labeled as “natural”. Recent progress in the application of highly-stable lipases in the organic solvents offers the possibility of employing various methods to the enzyme-catalyzed synthesis of monoacylglycerols, such as selective hydrolysis of fats and oils using 1,3-regiospecific lipases, the esterification of glycerol with fatty acids and the glycerolysis of fats or oils. In this review, different reaction systems such as aqueous–organic two-phase systems, microemulsions and reverse micelles systems, anhydrous organic solvents, solvent-free systems with free or immobilized lipases, as well as the use of two-phase membrane reactor systems are presented. We discuss some of the key factors, such as control of water content, removal of products from reaction system, and the effects of solvent on the lipase activity and selectivity, that must be addressed in order to obtain an efficient reaction system with high yields of monoacylglycerols. Engineering of the enzymatic monoacylglycerols synthesis processes requires also optimization of other factors such as: molar ratio of substrates, temperature, type of lipase immobilization and supports (if any), reactor design and operating regime.

**Ključne reči:** Lipaze • Esterifikacija • Hidroliza • Gliceroliza • Monoacilgliceroli

**Key words:** Lipases • Esterification • Hydrolysis • Glycerolysis • Monoacylglycerols