

## INDUSTRIJSKA BIOTEHNOLOGIJA I ZAŠTITA ZRAKA INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY AND AIR POLLUTION CONTROL

**Đurđa Vasić-Rački**

*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Savska c.16, 10000 Zagreb*

### SAŽETAK

Zbog sve izraženijeg utjecaja industrijskih procesa na okoliš, u posljednjem se desetljeću razvijaju alternativni za okoliš prihvatljivi procesi. Dugoročno rješenje održivosti se usredotočuje na tri glavna cilja: ekoinženjerstvo, smanjivanje otpada i sigurnost procesa. Koncept ekoinženjerstva je usmjeren prema dizajnu kemijskih procesa u kojima se smanjuje potrošnja energije, upotrebljavaju se obnovljive sirovine, koriste se specifičniji katalizatori koji pojednostavljaju procese obrade produkata, te integracija reakcijskih i operacijskih jedinica. Industrijska biotehnologija je jedan od potencijalnih načina unapređenja održive proizvodnje, jer može osigurati ostvarenje sva tri glavna cilja dugoročne održivosti kemijskih procesa. Industrijska biotehnologija je usmjerena na korištenje bioloških sustava za proizvodnju kemikalija, polimera i biogoriva (etanol). Ova tehnologija se uglavnom temelji na biokatalizi i provedbi biokatalitičkih procesa (koristi enzime i cijele stanice za katalitičke kemijske reakcije), te modernim fermentacijskim tehnologijama (usmjerenih na uporabu mikroorganizama-stanica: tvornica). Ona ima pozitivan utjecaj na okoliš i ekonomiju. Smanjuje se potrošnja energije, sirovina i emisije CO<sub>2</sub>, a opadaju i troškovi proizvodnje. U ovom radu će biti prikazan pozitivan učinak biokatalitičkih procesa na zrak, te mogućnost uporabe ove tehnologije za pročišćavanje zraka.

*Ključne riječi:* industrijska biotehnologija, biokatalizatori, E-faktor, kemijski i biokemijski procesi

### ABSTRACT

In last decade, the concern about the potential impact of industrial process has lead to environmentally more benign alternatives. The issue of long-term sustainability is focused in three major challenges: green engineering, waste minimization and inherently safer process. The concept of green engineering is directed towards the design of chemical processes that minimize energy consumption, use renewable raw materials and employ

more specific catalyst which allow simplifying the downstream process and to integrating reaction and operation units. Industrial biotechnology can be a potential route to improve manufacturing sustainability since it could provide important enhancements related to three major points of long-term sustainability. Industrial biotechnology is focused on use of biological systems for manufacturing of chemicals, polymers and biofuels (ethanol). This technology is based on the application of biocatalysis and fermentation technology in chemical industry and the implementation of the biocatalytic processes. Industrial biotechnology employs enzymes and whole cells for the catalytic chemical reactions and has positive impact on the environment and economy. In the biocatalytic processes the energy consumption, as well as the raw material use is lower. The beneficial effect on greenhouse emissions is obvious, and manufacturing costs also decrease. The positive effect of biocatalytic processes on the air pollution as well as the possibility to use the industrial biotechnology for the air pollution prevention will be discussed in this paper.

*Keywords:* Industrial Biotechnology, biocatalysts, E-factor, chemical and biochemical processes

### 1 UVOD

Napredak istraživanja u znanosti o životu pridonosi poboljšanju zdravlja, zaštiti okoliša, te industrijskoj i poljoprivrednoj proizvodnji i proizvodnji energije. Uspješna primjena rezultata tih istraživanja osigurava održivi rast i restrukturiranje industrije. Stoga je uz informacijsku i komunikacijsku tehnologiju, bioinformatiku i nanotehnologiju, biotehnologija prepoznata kao ključni pokretač održivog ekonomskog rasta te temelj ekonomije koja koristi obnovljive bioresurse, uspješne bioprocese i eko-industrijske klastere za proizvodnju bioprodukata, što osigurava nova radna mjesta i povećanje nacionalnog dohodka (Demain 2000, Gavrilescu and Chisti 2005).

Trenutno se u svijetu snažno razvija treći val

biotehnologije – industrijska biotehnologija (OECD 2001, Drumm, L. 2005, Caesar, B. 2008), koja se uvodi u proizvodnju i industriju kao alternativna tehnologija sa tradicionalnijim fizikalno-kemijskim značajkama. Industrijska biotehnologija, koja se još naziva i «bijela» tehnologija je odvojena od «crvene» biotehnologije (usmjerene na brigu o zdravlju) i «zelene» biotehnologije (usmjerene na genetsku promjenu biljaka – poljoprivredne kulture). Industrijska biotehnologija je usmjerena na korištenje bioloških sustava za proizvodnju kemikalija, polimera i biogoriva (etanol, vodik) (Caesar 2008). Ova tehnologija se uglavnom temelji na biokatalizi i provedbi biokatalitičkih procesa (koristi enzime i cijele stanice za katalitičke kemijske reakcije), te modernim fermentacijskim tehnologijama (koje su usmjerene na uporabu mikroorganizama – stanica = tvornica). Industrijska biotehnologija ima pozitivan utjecaj na okoliš i ekonomiju. Smanjuje se potrošnja energije, sirovina i emisije CO<sub>2</sub>, a opadaju i troškovi proizvodnje. McKinsey-eva analiza pokazuje da će se do 2010. preko 60% produkata u segmentu posebnih (engl. fine) kemikalija proizvoditi upotrebom industrijske biotehnologije, jer su tehnike rekombinantne DNA omogućile da se 5-10 godišnji period potreban za razvoj industrijskog biokatalizatora smanji na rok od 1-2 godine, što će značajno smanjiti vrijeme razvoja industrijskih biokatalitičkih procesa.

Europa je prepoznala potencijal industrijske biotehnologije za održivu kemijsku industriju, jednu od visoko akumulativnih industrija (Wubbolts 2007.) i napravljena je vizija razvoja ove tehnologije u Europi (Europabio 2003., Europabio 2004.).

Kroz cijelu povijest čovječanstva mikroorganizmi imaju ogromnu socijalnu i ekonomsku važnost (Vasić-Rački 2006). Tijekom vremena je otkriveno da mikroorganizmi mogu promijeniti neke stvari kroz jednostavne dobro definirane kemijske reakcije koje kataliziraju enzimi. Danas se te reakcije nazivaju biotransformacijama. Biotransformacije su prema tome reakcije pretvorbe reaktanata u jednom ili dva reakcijska koraka u strukturno slične produkte. Ove reakcije kataliziraju biokatalizatori: pročišćeni enzimi ili enzimi u cijelim stanicama mikroorganizama.

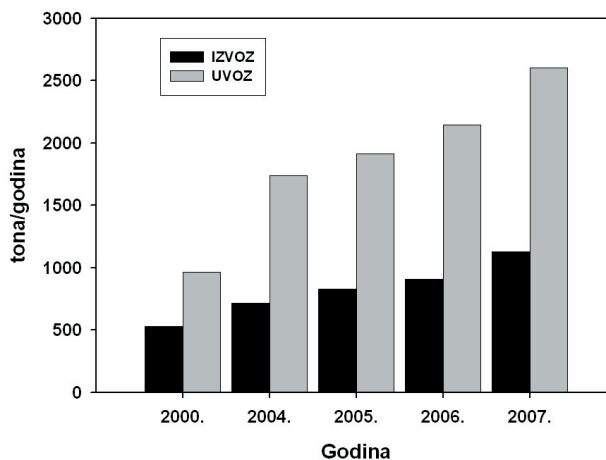
U usporedbi s tradicionalnim fermentacijskim procesima pri provedbi biotransformacija nastaje manje nusprodukata, nisu potrebni skupi energetski zahtjevni fermentori, aeracija, miješanje i sterilnost pri istovremenoj proizvodnji velikih količina biomase. Pročišćeni enzimi su posebno korisni ako reakcija koju kataliziraju mora biti potpuna, ako nisu inhibirani produktom te ako su aktivni i pri niskim koncentracijama reaktanta (npr. pri detoksifikacijskim reakcijama gdje su zagađivači prisutni

u otpadnim tokovima). Mogućnost provedbe više enzimskih reakcija na jednom aktivnom centru je daleko pogodnija negoli uporaba više katalizatora ili reakcija pri ekstremnim uvjetima temperature i tlaka i u prisustvu opasnih kemikalija. Do sada su se u industriji s pročišćenim enzimima provodile uglavnom biotransformacije katalizirane hidrolitičkim enzimima (npr. hidroliza penicilina G, hidroliza cephalosporina, hidroliza akrilonitrila, itd.), a oksido-redukcije su se provodile s enzimima u cijelim živim stanicama (oksidacija sorbitola u L-sorbozu, steroselktivna hidroksilacija steroida), zbog toga što oksido-redukcijski enzimi za svoje katalitičko djelovanje trebaju skup koenzim. Otkrivanje jeftinog načina istovremene reakcije regeneracije koenzima s formijatom dehidrogenazom otvorilo je put industrijskoj primjeni i ovih reakcija (sinteza L-terc-leucina: Kragl et al, 1996).

Biotransformacije pri blagim uvjetima sa regio- i enantio-selektivnim biokatalizatorima su ekološka i ekonomska alternativa u kemijskoj, farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji, jer kemo-, regio i steroselktivne biotransformacije mogu pojednostavniti proizvodne procese i učiniti ih ekonomski atraktivnijim i prihvatljivim za okoliš, samo ako se poveća stabilnost biokatalizatora, poveća produktivnost biokatalitičkog procesa, pronade jeftin način regeneracije koenzima i smanje troškovi izolacije i pročišćavanja bioprodukta (Vasić-Rački 2006).

## 2 KEMIJSKA INDUSTRIJA I OKOLIŠ

Kemijska industrija je velika svjetska industrija i vrijednost svjetske proizvodnje za 2002 je procijenjena na 1,3 bilijuna. I u Republici Hrvatskoj je kemijska industrija velika industrija (tablica 1) i treći izvoznik (slika 1) (Pehneć –Pavlović 2008). Stoga se posebna pažnja posvećuje odnosu te industrije i okoliša.



Slika 1. Uvoz i izvoz kemikalija i kemijskih proizvoda u Republici Hrvatskoj (Pehneć-Pavlović 2008)

**Tablica 1. Proizvodnja u najvažnijim sektorima kemijske industrije u razdoblju od 2000-2007. godine izražena u tonama (Pehneć-Pavlović 2008)**

|  | 2000.     | 2004.     | 2005.     | 2006.     | 2007.     |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Mineralna gnojiva                        | 1.284.249 | 1.885.971 | 1.846.139 | 1.849.367 | 2.009.206 |
| Polimeri                                 | 181.203   | 183.195   | 202.359   | 196.648   | 216.432   |
| Pesticidi i drugi agrokemijski proizvodi | 7.070     | 7.642     | 4.942     | 5.421     | 4.823     |
| Boje i lakovi                            | 33.724    | 44.740    | 54.958    | 55.901    | 63.042    |
| Osnovne farmaceutske sirovine i lijekovi | 7.449     | 6.740     | 6.797     | 4.061     | 4.741     |
| Sredstva za pranje i čišćenje            | 51.886    | 61.138    | 71.225    | 74.398    | 84.927    |
| Kozmetika                                | 2.784     | 2.813     | 2.707     | 2.869     | 2.928     |

## 2.1 E-faktor prihvatljivosti procesa za okoliš

Za predodžbu o potencijalnoj prihvatljivosti kemijskih ili srodnih procesa za okoliš koristi se tzv. E-faktor (Sheldon 1994, Arends et al. 2007). E-faktor se definira kao maseni omjer proizvedenog otpada po masi željenog produkta. U Tablici 2 je prikazan ovaj faktor u nekoliko segmenata procesne industrije. Kako pokazuje tablica 1 najčišća je rafinerijska proizvodnja u kojoj su napravljene tehnološke inovacije koje značajno doprinose zaštiti okoliša. Iznenađujuće je da je najprljavija proizvodnja u farmaceutskoj industriji pri proizvodnji lijekova i njihovih aktivnih supstanci. To je zbog toga što se sinteza kompleksnih kemikalija, koje su aktivne supstance lijekova, najčešće provodi u nekoliko stupnjeva, te se veoma često reagensi ne koriste u stehiometrijskom omjeru već u suvišku. Otpad koji se prilikom te proizvodnje generira je najčešće opasan otpad, a čine ga reagensi, otapala, procesni mediji, te utrošena goriva. U E-faktor nije uključena voda, ali su uključena onečišćenja u njoj, kao npr. soli i organske tvari. Prema tome visoki E-faktor znači jak negativni utjecaj na okoliš,

a idealno bi bilo kad bi vrijednost tog faktora bila jednaka nuli. Industrijska biotehnologija je prvenstveno našla primjenu u farmaceutskoj industriji zbog visokog E-faktora u toj industriji (tablica 2). Isto tako se koristi za proizvodnju bioetanola čija proizvodnja ima zatvorenu bilancu CO<sub>2</sub>. Pokazano je da se pri korištenju bioetanola 2004 smanjila količina emisije CO<sub>2</sub> u SAD približno 7,03 milijuna tona što je jednako smanjenju milijun automobila godišnje. (Perlack et al 2005, Kamm et al. 2006).

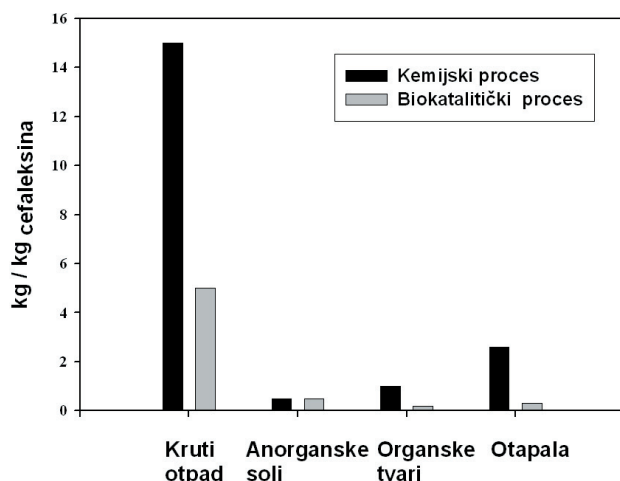
### 2.1.1 Antibiotici: Usporedba kemijskog i biokatalitičkog procesa prema E-faktoru

β-Laktamska grupa antibiotika uključuje cefaleksin koji je aktivan na gram-negativne bakterije i manje je toksičan od penicilina. Biokatalitički se proizvodi u DSM-u u Nizozemskoj. Kemijski proces je imao šest reakcijskih stupnjeva, a s biokatalitičkim koji ima samo tri reakcijska stupnja je zamijenjen 1995. Sirovina u kemijskom procesu je bio toksičan benzaldehid, a za biokatalitički je 7-aminodeacetoksi cefalosporanska kiselina koja se fermentacijski proizvodi iz glukoze. Uz smanjenje količine otpada

**Tablica 2. E-faktor procesne industrije**

| Industrijski segment | Godišnja proizvodnja              | E-Faktor [kg otpada/kg produkta] |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Rafinerije           | 10 <sup>6</sup> - 10 <sup>8</sup> | <0,1                             |
| Tonažne kemikalije   | 10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup> | <1-5                             |
| Posebne kemikalije   | 10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>  | 5 - >50                          |
| Lijekovi             | 10 - 10 <sup>3</sup>              | 25 - >100                        |

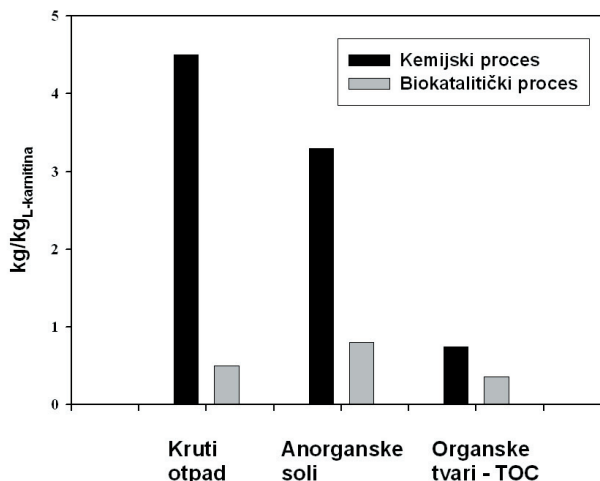
(slika 2.) u biokatalitičkom procesu je smanjena i njegova toksičnost (npr. nema metilen-klorida) (OECD 2001).



Slika 2. Usporedba količine otpada pri proizvodnji antibiotika-cefaleksina

### 2.1.2 Vitamini: Usporedba kemijskog i biokatalitičkog procesa prema E-faktoru

L-Karnitin (Shaw et al. 2003, Meyer and Robins 2005) je aktivna tvar otkrivena u mesu prije 100 godina. Sudjeluje u metabolizmu masti, te ubrzava oporavak mišića nakon intenzivnih vježbi posebice kod sportaša. D-karnitin nije siguran za ljudsku konzumaciju, pa je potrebno proizvoditi samo potpuno čist L-karnitin. L-karnitin se može proizvesti ekstrakcijom iz prirodne sirovine (životinjsko meso), kemijski-asimetričnom sintezom, biokatalitički i fermentacijom. Ekstrakcija iz mesa nije ekonomična, a i životinjsko meso kao sirovina zbog potencijalne mikrobiološke, virusne i prionske kontaminacije nije preporučljivo. Polazna sirovina za kemijsku sintezu su jeftine kemikalije kao što su epiklorhidrin i trimetilamin. Međutim konačan produkt nije čist L-karnitin već u njemu ima neki mali postotak D-karnitina, a i proizvodi se velika količina otpada. Zato kemijska sinteza nije atraktivna. Biokatalitički proces koji je razvijen u LONZA-i, Švicarska (Meyer and Robins 2005) koristi kao sirovinu 4-butirbetain i u njemu se ostvaruje 99,5%-tno iskorištenje na čistom L-karnitinu visoke koncentracije. Ovako visoko iskorištenje pojednostavljuje operacije izolacije i smanjuje cijenu proizvodnje. Na slici 3 je pokazano da je bioproces



Slika 3. Usporedba količine otpada pri proizvodnji L-karnitina

vidno čišći, jer se količina otpada za spaljivanje smanjila devet puta, količina soli četiri puta, a organski ugljik u otpadnim vodama je smanjen na polovicu.

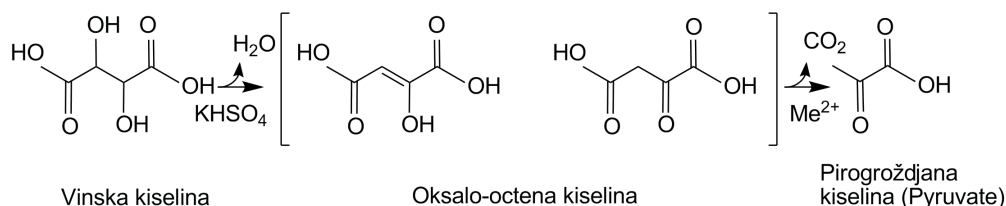
## 3 BIOTRANSFORMACIJE I SMANJENJE EMISIJE CO<sub>2</sub>

### 3.1 Sinteza pirogroždane kiseline iz glukoze

Pirogroždana kiselina i njezine soli su sirovine pri sintezi lijekova, agrokemikalija i dodataka hrani kao oksidansi masnoća (Zelić 2003). Koriste se i kao supstrati za enzimatsku proizvodnju amino kiseline L-dihidroksifenilalanina (L-DOPA-lijek za Parkinson-ovu bolest) (Li et al, 2001). Postoje dva postupka proizvodnje pirogroždane kiseline: klasičan kemijski i biokatalitički postupak.

#### 3.1.1 Klasični kemijski procesi proizvodnje pirogroždane kiseline

Postoji nekoliko kemijskih postupaka proizvodnje pirogroždane kiseline. U najstarije opisanom postupku (slika 4) pirogroždana kiselina se proizvodi dehidratacijom i dekarboksilacijom vinske kiseline uz kalijev hidrogen sulfat pri temperaturi 220°C (Howard and Fraser 1932). Postoje još postupci kao dekarboksilacija dietiltartarata (Sugiyama et al, 1992), oksidacija propilen glikola (Tsujino et al, 1992) i oksidativna dehidrogenacija mliječne kiseline (Ai and Ohdan 1995) uz teške metale kao katalizatore. Svi ovi postupci su energetski zahtjevni i

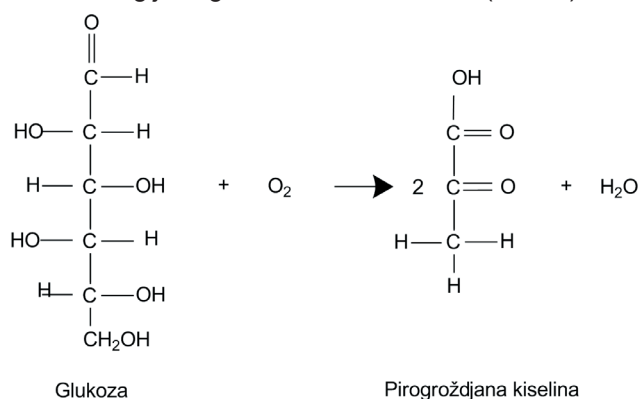


Slika 4. Kemijski proces proizvodnje pirogroždane kiseline

upotrebljavaju kao katalizatore teške metale. Prema tome nisu prihvatljivi za okoliš i zato su u posljednjih dvadeset godina razvijeni alternativni procesi.

### 3.1.2 Biotehnološki procesi

Ovi alternativni procesi se mogu podijeliti u tri grupe: sa pročišćenim enzimima (Burdick and Schaeffer 1987; Eisenberg et al, 1997); cijelim stanicama (Izumi et al, 1982; Ogawa et al, 2001; Schinschel and Simon 1993) i fermentacijama (Li et al, 2001; Yokota et al, 1994). Biokonverzija glukoze u pirogroždanu kiselinu sa genetski modificiranom *Escherichia coli* YYC202 IdhA: Kan prikazana na slici 5 (Zelić 2003, Zelić et al, 2003a, Zelić et al, 2004, Zelić et al, 2004a), nudi mogućnost proizvodnje pirogroždane kiseline na održiv način iz obnovljive sirovine (glukoze) uz osjetno smanjenu količinu ugljičnog dioksida u atmosferu (slika 6).



Glukoza

Pirogroždana kiselina

Slika 5. Bioprocen proizvodnje pirogroždane kiseline

### 3.2 Sinteza L-jabučne kiseline

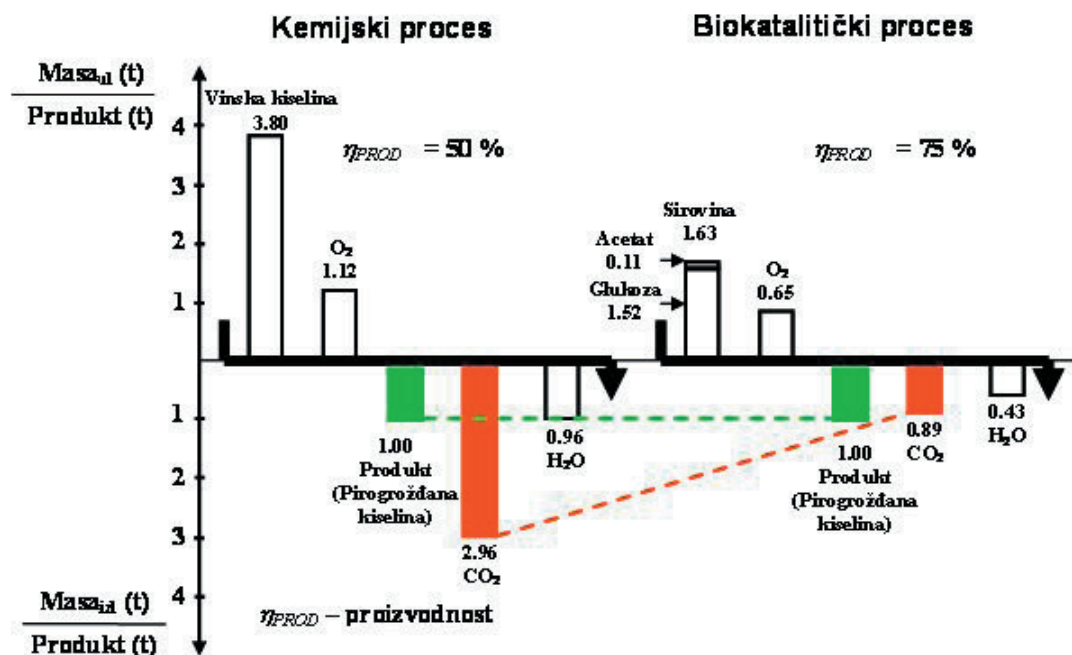
Proizvodnja jabučne kiseline je veoma zanimljiva jer se ova četvero ugljična di-karboksilna kiselina u racemičnom obliku široko koristi za zakiseljavanje hrane i pića u prehrambenoj industriji (Giacobbe et al, 1980). Čisti S-izomer (ili L-izomer) koji pokriva 10% tržišta jabučne kiseline (Bressler et al, 2002) se upotrebljava u infuzijskim otopinama i za tretman hiperamonemije i disfunkcije jetre u medicini (Goldberg et al, 1991). L-izomer se koristi u energetskim pićima zajedno s aspartamom kao fiksator okusa i kao emulgator pri proizvodnji margarina i majoneza. L-jabučna kiselina je monomer pri sintezi biorazgradljivih polimera (Rossignol et al, 1999; Wada et al, 1996). Procjena je da se godišnje troši oko 40 000 t jabučne kiseline u svijetu.

Tradicionalna metoda pripreme L-jabučne kiseline je ekstrakcijom iz jabučnog soka koji sadrži svega 0,4-0,7% L-jabučne kiseline i zato taj način pripreme nije ekonomičan.

Danas se industrijski jabučna kiselina proizvodi kemijskom sintezom iz maleinske ili fumarne kiseline hidratacijom pri visokim temperaturama i tlakovima i enzimatskom sintezom iz fumarne kiseline.

#### 3.2.1 Kemijski proces

R,S – jabučna kiselina (L,D-racemat) se dobiva hidratacijom maleinske kiseline pri temperaturi 90 – 175°C u prisustvu jake baze – natrijevog hidroksida (NaOH) (Erickson et al. 1959). Kako je maleinska kiselina pri temperaturi 165 – 170°C jako korozivna koristi se reaktor izrađen od olova (Reznikov and

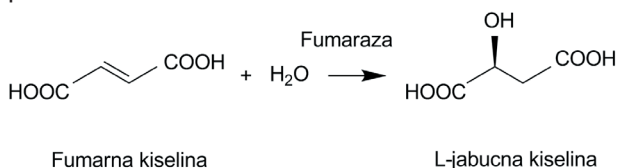


Slika 6. Usporedba kemijskog i bioprocena proizvodnje pirogroždane kiseline (Zelić 2003)

Grudev 1957). U jednoj od varijanti kemijskog procesa se koristi i sumporna kiselina. Ovo upućuje na činjenicu da kemijski proces kojim se proizvodi samo racemat nije prihvatljiv za okoliš i nije čist proces. Međutim iako se pri proizvodnji jabučne kiseline koriste opasne kiseline on je još uvijek ekonomičniji od biokatalitičkog procesa i LONZA je nedavno (LONZA 1997) u Scanzorosciate, Italija, pokrenula novo postrojenje za kemijsku proizvodnju.

### 3.2.2 Biokatalitički proces

Reakcija koju katalizira biokatalizator fumaraza je prikaza na slici 7.



**Slika 7. Biokatalitička dehidratacija fumarne u L-jabučnu kiselinu**

Fumarna kiselina se biotransformira u L-jabučnu kiselinu adicijom vode na dvostruku vezu. Proces je tipičan ravnotežan proces, a enzim je stereospecifičan. Fumarna kiselina je nusprodukt pri proizvodnji ftalnog anhidrida. Primjena fumarne kiseline u industriji je ograničena jer je ova kiselina slabo topiva i zato je L-jabučna kiselina prihvatljiv produkt. Iako je biokatalitički proces prihvatljiviji za okoliš (koristi kao sirovinu otpad iz drugog procesa i nije energetski zahtjevan) još uvijek je cijena L-jabučne kiseline tako proizvedene viša nego kemijski proizvedenog racemata. Stoga su potrebna daljnje istraživanja da proces postane ekonomičniji (Vrsalović-Presečki et al. 2007).

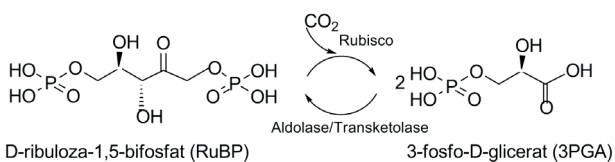
U trenutno razvijenom industrijskom procesu, fumarna kiselina se kontinuirano konvertira u L-jabučnu kiselinu uz imobilizirane cijele stanice *Brevibacterium ammoniagenes* ili *Brevibacterium flavum* (Takata and Tosa, 1993) koje sadržavaju enzim fumarazu visoke aktivnosti. Iskorištenje na L-jabučnoj kiselini je oko 70%, a nekonvertirana se fumarna kiselina reciklira. Biokatalitički se proces provodi pri neutralnom pH, a produkt je sol L-jabučne kiseline. Prema tome proces izolacije uključuje samo odvajanje neproreagirane sirovine i oslobađanje kiseline iz njene soli. Osim ovog kontinuiranog procesa postoji i šaržni proces sa *Corynebacterium glutamicum* (Daneel and Faurie 1994) ali je kontinuirani ekonomičniji.

## 4 BIOTRANSFORMACIJE I PROČIŠĆAVANJE ZRAKA

### 4.1 Biokatalitički proces vezanja CO<sub>2</sub>

Biokatalitički proces vezanja CO<sub>2</sub> iz atmosfere je

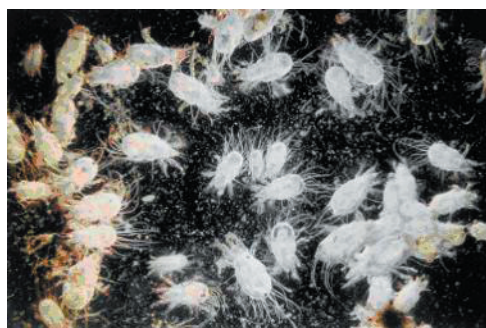
proces koji oponaša prirodu i ono što se događa u stanicama biljaka (Bhattacharya et al, 2002, Chakrabarti et al. 2003). Taj proces je razvijen u tri faze. U prvoj fazi se atmosferski CO<sub>2</sub> najprije koncentrira i otapa, a zatim se u drugoj fazi biokatalitički veže na akceptor ugljika D-ribuloza-1,5-difosfat (RuBP) (slika 9). Ovu reakciju katalizira enzimski kompleks Rubisco koji se dobiva iz špinata. Produkt ovog procesa je 3-fosfo-D-glicerat (3PGA). Ovaj produkt se u drugoj fazi uz biokatalizatore: aldolaza/transketolaza ponovo prevodi u akceptor ugljika RuBP. Na taj način se skup i kompleksan akceptor ugljikovog dioksida RuBP regenerira. Ovaj proces je patentiran (Bhattacharya 2001).



**Slika 8. Biokatalitički proces vezanja CO<sub>2</sub>**

### 4.2 Biofiltri

Tradicionalna biološka strategija kontrole onečišćenja zraka se temelji na uporabi biofiltara koji koriste prirodna filtarska sredstva kao npr. zemlju ili prirodne organske materijale kao treset, kompost ili koru drveta. Onečišćenja se iz zraka uklanjaju mješovitim kulturama mikroorganizama koji žive u tim prirodnim filtarskim sredstvima (Veiga et al. 1999). Biofiltracija, ovako primijenjena je poznata kao jednostavna i jeftina tehnologija. Međutim za uspješnije uklanjanje para posebice veoma toksičnih kemikalija, u posljednje se vrijeme koriste stanice čistih mikrobioloških kultura u kojima se nalaze točno definirani biokatalizatori. Uz ove biokatalizatore se u potpunosti razgrađuju toksične kemikalije do ugljičnog dioksida i vode ili se toksične kemikalije konvertiraju u manje opasne, a za daljnju industrijsku preradu važne kemikalije. U tom slučaju pročišćavanje zraka postaje ekonomičan proces. Za tu svrhu se stanice mikroorganizma imobiliziraju na inertne nosioce kao npr. perlit, razni polimeri itd. (slika 9) (Prado et al. 2002).



**Slika 9. Pseudomonas sp., Bacillus sp., and fungus Trichosporon beigellii, mikroorganizmi imobilizirani na perlit. (Prado 2002)**

Tako se npr. stiren (monomer za sintezu polimera) koji je veoma hlapiv i obično se suvišak njegovih pare pri proizvodnji u kojoj se koristi, ispuštaju u atmosferu, uklanja u biofiltru u kojemu se kao filtarsko sredstvo koristi perlit na koji su imobilizirane stanice mikroorganizma *Rhodococcus pyridinovorans*, koje sa 78%-tnom uspješnosti uklanjaju stiren pri maksimalnoj brzini uklanjanja koja je iznosi  $279 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Jung and Park 2005).

Akrilonitril je kemikalija koja se koristi za proizvodnju monomera akrilamida. Tijekom proizvodnje i transporta se oslobađaju njegove veoma toksične pare. Stoga je razvijen proces u kojemu se te pare konvertiraju u amonijev akrilat, manje toksičnu, ali široko upotrebljavanu kemikaliju. Proces katalizira biokatalizator nitrilaza (Webster 1996). Nadalje stanice mikroorganizma *Rhodococcus rubber* koje sadrže biokatalizator nitrilazu su imobilizirane na ringove od sintetskog polimera (ImmobaSil™) koji su kao filtarsko sredstvo smješteni u „trickle-bed“ kolonu kroz koju je strujao zrak s akrilonitrilom. Biokatalizator je bio stabilan 70 dana, a uz 95%-tnu uspješnost uklanjanja akrilonitrila imao je maksimalnu brzinu uklanjanja od  $4,0 \text{ kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$ , dok je uz 90%-tnu uspješnost ta brzina bila  $7,2 \text{ kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$  (Roach et al. 2004).

## 5 ZAKLJUČAK

Navedeni primjeri u ovom radu pokazuju veoma široku primjenu biokatalizatora, koji su sami po sebi biorazgradljivi i proizvod su živih stanica, pa su i obnovljivi, te su kao takvi prihvatljivi za okoliš. Procesi u kojima se koriste troše manje energije, jer su bioprocesi procesi koji se provode pri atmosferskom tlaku i temperaturi u području od 20 do 80°C, pa tako posredno pridonose smanjenu emisije plinova u zrak i njegovoj kakvoći. U biokatalitičkim procesima se kao sirovine mogu koristiti otpadne tvari iz drugih procesa, čime se smanjuje količina proizvedenog otpada, koji se najčešće kao opasan otpad mora paliti, čime se onečišćuje zrak. Biokatalizatori i sami kako je pokazano mogu katalizirati procese vezanja ugljičnog dioksida iz atmosfere, te i tako pridonose zaštiti zraka. I na kraju koriste se za pročišćavanje zraka od para posebno toksičnih kemikalija.

## 6 LITERATURA

1. Ai, M., Ohdan, K. (1995) Formation of pyruvic acid by oxidative dehydrogenation of lactic acid. *Chem. Lett.*, 5: 405.
2. Arends I., Sheldon R., Hanefeld U., (2007) Introduction. In: *Green Chemistry and Catalysis*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, p 2-3.
3. Bhattacharya, S., Chakrabarti, S., Bhattacharya, S.K. (2002) Bioprocess for recyclable CO<sub>2</sub> fixation: A general description. In: *Recent research and developments in biotechnology and bioengineering*. Eds.: Bhattacharya S.K, Chakrabarti S., Mal T.K., Kerala- Research Signpost India. p 109-120.
4. Bhattacharya, S.K. (2001) Conversion of carbon dioxide from ICE engine exhausts by fixation. US patent 6258335, p 1-18.
5. Bressler, E., Pines, O., Goldberg, I., Braun, S. (2002) Conversion of fumaric acid to L-malic acid by sol-gel immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in supported liquid membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, 18: 445-450.
6. Burdick, B.A., Schaeffer, J. R. (1987) Co-immobilized coupled enzyme systems on nylon mesh capable of gluconic acid and pyruvic acid production. *Biotechnol. Lett.*, 9:253-258.
7. Chakrabarti S., Bhattacharya S., Bhattacharya S.K. (2003) Biochemical Engineering: cues from cells. *Trends in Biotechnol.*, 21:204-209.
8. Caesar, B., (2008) Industrial biotechnology: More than just ethanol-Factors driving industry growth. *Ind. Biotechnol.*, 4:50-54.
9. Daneel, H. J., Faurie, R. (1994) Verfahren zur Herstellung von L-Äpfelsäure aus Fumarsäure. AMINO GmbH, DE 44246664 C1.
10. Demain, A., (2000) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnol. Adv.*, 18:499-514.
11. Drumm, L. (2005) Increasing the penetration rate of biotechnology in the chemical industry. *Ind. Biotechnol.*, 1: 244-246.
12. Eisenberg, A., Seip, J.E., Gavagan, J.E., Payne, M.S., Anton, D.L., DiCosino, R. (1997) Pyruvic acid production using methylotropic yeast transformations as catalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2:223-232.
13. Erickson, L.E., Alberty, R.A. (1959) Kinetics of mechanism of the base-catalyzed hydration of fumarate to malate. *J. Phys. Chem.*, 63: 705.
14. Europabio (2003) White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future, Working document from Europabio. April 2003.
15. Europabio (2004) Industrial or White Biotechnology. A driver of sustainable growth in Europe. Working document from Europabio and ESAB to be used as input for the Industrial Biotechnology section of the European Technology Platform for Sustainable Chemistry. July 2004.
16. Gavrilescu M., Chisti Y., (2005) Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry, *Biotechnol. Adv.*, 23:471-499.
17. Giacobbe, F., Isonna, A., Marconi, W., Morisi, F., Prosperi, G. (1980) Novel enzymatic production of L-malic acid as an alternative acidulant to citric acid. In: *Enzyme engineering: Future directions*.

- Eds.: Wingard, L.B., Berezin, I.V., Klyosov, A.A., Plenum Press, New York, p. 439.
18. Goldberg, I., Peleg, Y., Rokem, S. (1991) Citric, fumaric and malic acids. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. Eds.: Goldberg, I., Williams, R., Van Nostrand-Reinhold, New York, p 349-347.
19. Howard, J. W., Fraser, W. A. (1932) Pyruvic acid. *Org. Synth. Coll.*, 1:475-476.
20. Izumi, Y., Matsumura, Y., Tani, Y., Yamada, H. (1982) Pyruvic acid production from 1,2-propanediol by thiamin-requiring *Acinetobacter* sp. 80-M. *Agric. Biol. Chem.*, 46:1673-2679.
21. Jung, In-G., Park, C-Ho. Characteristic of styrene degradation by *Rhodococcus pyridinovorans*, *Chemosphere*, 61:451-456.
22. Kamm, B., Kamm, M., Grubber, P.R., Kromus, S. (2006) Biorefinery Systems- An Overview. In *Biorefineries – Industrial Processes and Products, Status quo and Future Direction*. Eds. Kamm, B., Gruber P.R., Kamm, M., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, p 3 – 40.
23. Kragl, U., Vasic-Racki, D., Wandrey, C. (1996) Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors - Modelling and computer simulation. *Bioprocess Eng.*, 14: 291-297.
24. Li, Y., Chen, J., Lun, S-Y. (2001) Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57:451-459.
25. Meyer H-P., Robins K.T. (2005) Large Scale Bioprocess for the Production of Optically Pure L-Carnitine, *Monatshefte für Chemie*, 136:1269-1277.
26. OECD: The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability-Sustainable Development, OECD publication, 2001, 59-63.
27. Ogawa, J., Soon, C-L, Ito, M., Shimizu, S. (2001) Enzymatic production of pyruvate from fumarate-an application of microbial cyclic-imide-transforming pathway. *J.Mol.Catal. B: Enzym.*, 11: 355-359.
28. Pehcec-Pavlović, G.(2008) Pregled stanja kemijske industrije. 5.Sjednica Udruženja kemijske industrije, Zagreb, 17.ožujak. HGK, Zagreb.
29. Perlack, R.D., Wright, L.L., Turhollow, A.F., Graham, R.L., Stokes, B.J., Erbach, D.C. (2005) Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. Reports of U.S. Department of Energy and U.S. Department of Agriculture. P 1-78. <http://www.eere.energy.gov/biomass/publications.html>.
30. Prado, Ó.J., Mendoza, J.A., Veiga, M.C., Kennes, C. (2002) Optimization of nutrient supply on downflow gas-phase biofilter packed with an inert carrier. *Appl. Microbiol.Biotechnol.*, 59:567-573.
31. Reznikov, I.G., Grudev, I.L. (1957) U.S.S.R. Pat. 105,540.
32. Roach, P.C.J., Ramsden, D.K., Hughes, J., Williams, P. (2004) Biocatalytic Scrubbing of Gaseous Acrylonitrile Using *Rhodococcus ruber* Immobilized in Synthetic Silicone Polymer (ImmobaSil™) Rings. *Biotechnol.Bioeng.*, 85:450-455.
33. Rossignol, H., Boustta, M., Vert, M. (1999) Synthetic poly(hydroxyalkanoates) with carboxylic acid or primary amine pendent groups and their complexes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 25: 255-264.
34. Schinschel, C., Simon H. (1993) Preparation of pyruvate from R-lactate with *Proteus* species. *J. Biotechnol.*, 31:191-203.
35. Shaw, N.M., Robins, K.T., Kiener, A. (2003) Biocatalytic Approaches for the Large-Scale Production of Asymmetric Synthons: L-Carnitine. In *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale*. Eds.: Blaser H.U., Schmidt E., Wiley –VCH, 206-207.
36. Sheldon, R.A. (1994) Consider the environmental quotient. *Chemtech.*, 24:38-47.
37. Sugiyama, S., Fukunaga, S., Kawashiro, K. (1992) Catalytic conversion of diethyl tartarate into pyruvate over silica-supported potassium disulfate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 65:2083-2085.
38. Takata, I., Tosa, T. (1993) Production of L-malic acid. In: *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. Eds.:Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T., Marcel Dekker Inc. New York, p 53-66
39. Tsujino, T., Ohigashi, S., Sugiyama, S., Kawashiro, K., Hayashi, H. (1992) Oxidation of propylene glycol and lactic acid to pyruvic acid in aqueous phase catalyzed by lead modified palladium-on-carbon and related systems. *J. Mol. Catal.* 71:25-35.
40. Vasić-Rački, Đ. (2006) History of Industrial Biotransformations-Dreams and Realities. In: *Industrial Biotransformations*. Eds.: Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., Wiley-VCH, Weinheim, p. 3-29.
41. Veiga, M.C.) Fraga, M., Amor, L., Kennes, C. (1999) Biofilter performance and characterization of biocatalyst degrading alkylbenzene gases. *Biodegradation* 10: 169-176.
42. Vrsalović-Presečki, A., Zelić, B., Vasić-Rački, Đ. (2007) Comparison of the L-malic production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 41: 605-612.
43. Wada, R., Hyon, S.-H., Ikada, Y. (1996) New biodegradable oligoesters for pharmaceutical application. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 7: 715-725.
44. Webster, N.A. (1996) The development of biocatalytic process for the conversion of acrylonitrile to ammonium acrylate. PhD Thesis, University



of Huddersfeld, West Yorkshire, UK.

45. Wubbolts, M., (2007) The Future is White! Prospects of White Biotechnology. DSM Innovation Center. Opening Lecture, January 15th.

46. Yokota, A., Shimizu, Y., Teresawa, Y., Takao-ka, N., Tomita, F. (1994) Pyruvic acid production by a lipoic acid auxotroph of *Escherichia coli* W1485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41:638-643.

47. Zelić, B. (2003) Study of the process development for *Escherichia coli* based pyruvate production, Dissertation, University of Zagreb, Faculty of Chemical Technology and Engineering, Zagreb, Croatia. (in English).

48. Zelić, B., Gerharz, T., Bott, M., Vasić-Rački, Đ., Wandrey, C., Takors, R. (2003a) Fed-batch process for pyruvate production by recombinant *Escherichia coli* YYC202 strain. *Chem. Eng. J.: Eng Life Sci.*, 3:299-305.

49. Zelić, B., Gostović, S., Vuorilehto, K., Vasić-Rački, Đ., Takors, R. (2004) Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electro dialysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 85:638-646.

50. Zelić, B., Vasić-Rački, Đ., Wandrey C, Takors, R. (2004a) Modeling of the pyruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 26:249-258.

51. Zelić, B., Vasić-Rački, Đ., (2006) Process development for *Escherichia coli* based pyruvate production. In: Focus on Biotechnology Research. Eds. Hearns E.C., Nova Science Publishers, Inc., p 1-26.

