

OLIVERA S. STAMENKOVIĆ<sup>1</sup>  
 MIODRAG L. LAZIĆ<sup>1</sup>  
 VLADA B. VELJKOVIĆ<sup>1</sup>  
 DEJAN U. SKALA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tehnološki fakultet,  
 Univerzitet u Nišu, Leskovac

<sup>2</sup>Tehnološko–metalurški fakultet,  
 Univerzitet u Beogradu,  
 Beograd

PREGLEDNI RAD

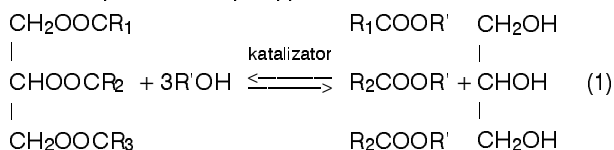
665.75.000.57+665.3+665.12

## DOBIJANJE BIODIZELA TRANSESTERIFIKACIJOM KATALIZOVANOM ENZIMIMA

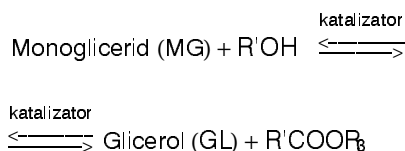
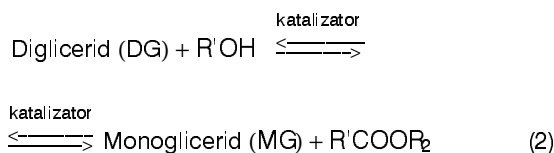
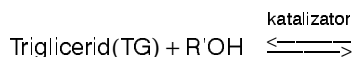
*U ovom radu razmotreni su principi i kinetika dobijanja biodizela iz biljnih ulja, transesterifikacijom katalizovanom lipazama. Pažnja je fokusirana na značajne faktore koji utiču na tok reakcije i prinos alkil estara, kao što su: vrsta i oblik lipaze, vrsta alkohola, prisustvo organskog rastvarača, sadržaj vode u uljima, molski odnos alkohola i ulja, temperatura i prisustvo glicerola. Radi sagledavanja perspektive za industrijsku primenu transesterifikacije katalizovane lipazama, takođe su razmotreni faktori koji utiču na kinetiku i efekte transesterifikacije katalizovane bazama i kiselinama. Ukazano je na prednosti enzimskog procesa u odnosu na hemijski, kao i na činjenicu da trans esterifikacija katalizovana lipazama mora biti značajno poboljšana da bi bila industrijski primenljiva.*

Alternativna goriva za dizel mašine postaju značajno interesantnija poslednjih godina zbog smanjenja rezervi nafte u svetu, kao i sa stanovišta zaštite životne sredine. Veliki broj studija pokazuje da monoalkil estri viših masnih kiselina (MEMK, biodizel) dobijenih iz obnovljivih bioloških izvora, kao što su biljna ulja i životinjske masti, poseduju osobine bliske karakteristikama dizel goriva, zbog čega su ozbiljan supstituent, delimično ili potpuno, konvencionalnog dizel goriva. Biodizel je biorazgradljiv i netoksičan pošto u svom sastavu ne sadrži sumporna jedinjenja pa pri sagorevanju ne dolazi do stvaranja sumpor(V) oksida, a i čađ se izdvaja u mnogo manjoj količini nego pri sagorevanju dizel goriva iz nafte [1]. Sagorevanje biodizela u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem je potpunije, zbog prisustva kiseonika u strukturi MEMK (10 – 11%) [2].

Po hemijskom sastavu, biodizel predstavlja smešu estara viših masnih kiselina i nižeg alkohola. Sinteza biodizela sastoji se u reakciji transesterifikacije, tj. u konverziji triglicerida viših masnih kiselina u njihove estre sa nižim alkoholima, pri čemu se izdvaja glicerol [3] prema sumarnoj stehiometrijskoj jednačini:



U suštini, to je složena reakcija u kojoj su tri osnovna stupnja u kojima nastaju diglicerid, monoglicerid, glicerol i alkil estri masnih kiselina:



gde su R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> i R' odgovarajuće alkil grupe. Na svakom stupnju oslobađa se po jedan mol alkil estra. Reakcija je povratna, a ravnoteža je na strani dobijanja estra i glicerola.

Sastav biodizela zavisi od sastava triglicerida i alkohola koji se koriste kao reaktanti. Kao izvori triglicerida, korišćena su suncokretovo, sojino, repičino i palmino ulje, ulja iz semena pamuka, duvana, kikirikija, *Jatropha ulje*, kao i korišćeno ulje iz velikih sistema za pripremu hrane i otpadno ulje iz proizvodnje rafiniranih ulja. Kvalitet ulja se odražava na fizičko–hemijske karakteristike metilestara, i to, pre svega, na viskozitet i peroksidni, jodni i saponifikacioni broj. Čak i korišćena ulja, loših fizičko–hemijskih karakteristika, mogu se uspešno prevesti u metilestre pod određenim reakcionim uslovima [4]. Alkoholi koji se mogu koristiti u transesterifikaciji su: metanol, etanol, propanol, butanol i amil alkohol. Metanol i etanol se najčešće koriste, a naročito metanol, zbog niske cene i pogodnih fizičkih osobina (polaran molekul kratkog lanca). Reakcija transesterifikacije može biti katalizovana kiselinama, bazama ili enzimima.

U ovom radu razmotreni su principi dobijanja biodizela enzimski katalizovanom transesterifikacijom, sa osvrtom na pojedinačne značajne faktore koji utiču na tok reakcije i naglaskom na vrste (poreklo) i oblik enzima (lipaze). Radi sagledavanja perspektive za industrijsku primenu transesterifikacije katalizovane lipazama, takođe su razmotreni kinetika transesterifikacije katalizovane bazama i kiselinama i uticajni faktori.

Adresa autora: O.S. Stamenković, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, 16000 Leskovac, Bulevar oslobođenja 124

Rad primljen: Februar 9, 2005

Rad prihvaćen: Mart 22, 2005

## TRANSESTERIFIKACIJA KATALIZOVANA KISELINAMA I BAZAMA

Na proces transesterifikacije katalizovan kiselinama ili bazama utiče veliki broj faktora od kojih su najvažniji: tip katalizatora, sadržaj vode, prisustvo slobodnih masnih kiselina, molski odnos alkohola i ulja, temperatura i uslovi mešanja. Za ekonomičnost procesa od značaja su, pored biodizela kao glavnog proizvoda, i mogućnost izdvajanja sporednih proizvoda (pre svega, glicerola) i optimizacija procesnih uslova.

Kao kiseli katalizatori najčešće se koriste mineralne (sumporna, fosforna, hlorovodonična) i organske sulfokiseline. U transesterifikaciji sa ovim katalizatorima ostvaruju se veoma visoki prinosi alkilestara, ali su reakcije spore, traju dugo (iznad 3 sata) i realizuju se na visokim temperaturama. U metanolizi sojinog ulja uz upotrebu sumporne kiseline (1% mol.) na temperaturi od 65°C dostiže se prinos estara iznad 99% za 50 sati, dok butanoliza (na 117°C) i etanoliza (78°C) pri istim uslovima traju 3 i 18 sati, respektivno [5]. Prema nekim autorima, kiselo katalizovana transesterifikacija je pogodnija za gliceride sa većim sadržajem slobodnih masnih kiselina i vode [6], dok po mišljenju drugih autora [7] kiselinski broj nije kritičan faktor za izbor tipa katalizatora. U metanolizi govedeg loja (uzorci sa kiselinskim brojem većim od 5 mg KOH/g) u prisustvu sumporne kiseline (1%) kao katalizatora ostvarena je 13% konverzija za 48 sati, dok se korišćenjem natrijum metoksida (1%) kao katalizatora transesterifikacija kvantitativno završava za manje od 3 sata, pri istim ostalim operativnim uslovima. Ako se izvodi in situ, kiselo katalizovana transesterifikacija je efikasnija u slučaju i suncokretovog [8] i sojinog [9] ulja.

Baze, najčešće korišćene kao katalizatori reakcije transesterifikacije, jesu: natrijum hidroksid, kalijum hidroksid, karbonati i odgovarajući natrijum i kalijum alkoksidi, kao, na primer: natrijum metoksid, natrijum etoksid, natrijum propoksid i natrijum butoksid. Najveći prinos biodizela se ostvaruje korišćenjem metoksida (natrijum i kalijum), jer su zanemarljivi gubici zbog saponifikacije triglicerida i rastvorljivosti metilestara u glicerolu, ali su oni skuplji i veoma higroskopni, zbog čega je rad sa njima otežan [10]. U komercijalne svrhe najčešće se koristi natrijum hidroksid, jer je znatno jeftiniji, a reakcija je brza [10]. Optimalna koncentracija alkalnog katalizatora je u intervalu 0,5 do 1% [2]. Na primer, optimalna koncentracija natrijum i kalijum hidroksida za transesterifikaciji rafinisanog suncokretovog ulja metanolom je 1%, a oba katalizatora su podjednako efikasna [11]. Povećana količina katalizatora, koja se najčešće dodaje da bi se kompenzovala povećana kiselost polaznog ulja, može da dovede do povećanja viskoziteta reakcione smeše, usled formiranja sapuna. Pored toga, dolazi i do rastvaranja metilestara u glicerolskom sloju, zbog čega se, nakon gravitacionog taloženja, smanjuje njihov prinos u estarskoj frakciji [12, 13]. Mala količina katalizatora ne omogućava da se reakcija alkoholize odigra do

kraja, pa su u smeši prisutni trigliceridi, što utiče na povećanje viskoziteta estara.

Pošto su baze manje korozivne od kiselina, a bazno katalizovana transesterifikacija znatno brža (oko 4000 puta) od kiselo katalizovane, one se češće koriste u komercijalnim procesima dobijanja biodizela [14].

Za bazno katalizovanu reakciju transesterifikacije nepoželjno je prisustvo vode u reaktantima (manje od 0,3% [11]), jer ona izaziva reakciju saponifikacije, zbog čega se smanjuje prinos estara, povećava viskozitet reakcione smeše i otežava izdvajanje glicerola. Pored toga, kiselinski broj glicerida mora biti manji od 1 mg KOH/g, jer je u suprotnom potrebna veća količina natrijum hidroksida, da bi se neutralisale slobodne masne kiseline [4]. Ispitivanja efekata slobodnih masnih kiselina i vode na transesterifikaciju glicerida iz govedeg loja sa metanolom su pokazala da se najbolja konverzija ostvaruje pri maksimalnom sadržaju vode u sirovinama od 0,06%, a slobodnih masnih kiselina od 0,5% [15]. Maksimalan sadržaj slobodnih masnih kiselina (0,5%) potvrđuju i rezultati drugih istraživača [14]. Sadržaj vode je kritičniji za transesterifikaciju od sadržaja slobodnih masnih kiselina [14].

Iako natrijum hidroksid i metoksid reaguju sa ugljen(IV) oksidom iz vazduha, čime se smanjuje njihova efikasnost, transesterifikacija ne zahteva inertnu atmosferu azota [14]. Reaktor je obično otvoren prema atmosferi preko kondenzatora, tako da se kiseonik rastvoren u ulju desorbuje pri zagrevanju reakcione smeše.

Jedan od najvažnijih parametara koji utiče na prinos estara u slučaju transesterifikacije katalizovane bazama ili kiselinama je molski odnos alkohol:ulje. Teorijski, potrebno je 3 mola metanola na svaki mol triglicerida (jednačina 1). Autori se, u principu, slažu da veći molski odnos ubrzava reakciju i omogućava bolju konverziju, ali otežava separaciju i poskupljuje recirkulaciju metanola [11]. Stvarni molski odnos zavisi od katalizatora. Na primer, da bi se ostvario isti prinos estara za određeno vreme, neophodan molski odnos butanola i sojinog ulja je 30:1 za kiselo katalizovanu, a 6:1 za bazno katalizovanu reakciju [5].

U slučaju bazno katalizovane transesterifikacije, u literaturi postoje različiti podaci o optimalnom odnosu alkohola i ulja. Molski odnos metanola i ulja treba da bude u opsegu 3,3:1 do 5,25:1 [16], s tim što veći molski odnos implicira kraće vreme reakcije i veći stepen konverzije [14]. Za transesterifikaciju repičinog ulja metanolom u prisustvu 1% natrijum ili kalijum hidroksida preporučuje se odnos 6:1 [17]. Kada je prisutna veća količina slobodnih masnih kiselina u ulju, potreban je veći molski odnos [18]. Ulja iz semena soje, suncokreta, kikirikija i pamuka se ponašaju slično i najveći stepen konverzije (93 – 98%) postiže se pri molskom odnosu 6:1 [19]. Ovaj odnos je korišćen i pri transesterifikaciji govedeg loja sa metanolom [20, 21]. Metanolizom rafinisanog suncokretovog ulja dobijaju se estri zadovoljavajuće čistoće pri molskom odnosu 4,5:1 i 6:1 [11].

Brzina reakcije transesterifikacije i prinos estara zavisi od temperature na kojoj se realizuje transesterifikacija. Transesterifikacija ricinusovog ulja metanolom protiče zadovoljavajuće na temperaturama od 20 do 35°C, pri molskom odnosu 6:1 do 12:1 i u prisustvu natrijum hidroksida u koncentraciji od 0,005 do 0,35% [22]. Viša temperatura ubrzava transesterifikaciju i skraćuje vreme reakcije. Na primer, prinos estara pri transesterifikaciji rafinisanog sojinog ulja metanolom pri molskom odnosu 6:1 u prisustvu 1% natrijum hidroksida je posle 0,1 sata bio 64, 87 i 94% na 32, 45 i 60°C, respektivno; posle jednog sata prinos estara na 45 i 60°C je bio isti, a na 32°C malo manji [19]. Generalno, reakcija transesterifikacije triglicerida se izvodi šaržno na atmosferskom pritisku i temperaturi 60 do 70°C u višku metanola [2]. Povećanje temperature iznad ove granice ima negativan efekat na konverziju. U prisustvu alkalnog katalizatora reakcija se odigrava i na sobnoj temperaturi sa zadovoljavajućim prinosom [11].

Proces transesterifikacije i prinos estara zavise od mešanja reakcione smeše. Reaktanti obrazuju dvofazni sistem, pa je reakcija kontrolisana difuzijom reaktanata između faza. Metilestri koji nastaju su zajednički rastvarač za obe faze, zbog čega postepeno nastaje jednofazni sistem. Zato je mešanje naročito bitno na početku reakcije. Na primer, zbog relativno male rastvorljivosti metanola u govedem loju, neophodno je dobro dispergovati metanol u ulju, da bi reakcija otpočela [23, 24]. Kada su faze dobro izmešane i reakcija otpočne, mešanje više nije potrebno. Ako se rastvor natrijum hidroksida u metanolu doda u otopljeni goveđi loj uz mešanje, brzina mešanja (110 do 330 min<sup>-1</sup>) i vreme mešanja na početku reakcije (1 do 3 minuta) nema uticaja na prinos estara [24]. O uticaju mešanja na stepen konverzije i vreme trajanja reakcije transesterifikacije ukazuju podaci iz metanolize sojinog ulja u šaržnom laboratorijskom reaktoru pri različitim brzinama mešanja [7]. Pri manjoj brzini mešanja (300 min<sup>-1</sup>) postiže se 12% konverzija nakon 8 sati reakcije, dok se pri brzini mešanja 600 min<sup>-1</sup> kompletna konverzija ostvaruje za manje od 2 sata. Zapaženo je da pri transesterifikaciji biljnih ulja intenzivnije mešanje poboljšava homogenizaciju reaktanata [25]. Transesterifikacija traje kraće i prinos estara je veći kada se reakciona smeša meša ultrazvukom niske frekvencije (28 i 40 kHz) nego li mehaničkom mešalicom, nezavisno od vrste alkohola i koncentracije i vrste katalizatora [13, 26].

Proizvod transesterifikacije triglicerida je mešavina estara, glicerola, alkohola, katalizatora i tri-, di- i monoglicerida. Dobijanje čistih estara nije lako naročito zbog prisustva di- i monoglicerida. Ovaj problem je naročito izražen u slučaju transesterifikacije životinjskih masti (goveđi loj). Sadržaj slobodnog glicerola u estarskoj frakciji (koji delimično zaostaje zbog nepotpunog odvajanja frakcija) ne sme da bude veći od 0,3 mg/g. Ako se estar koristi kao gorivo, tokom sagorevanja glicerola dolazi do stvaranja akroleina, ekološki nepodobne sup-

stance. Sadržaj ukupnog glicerola u glicerolskoj frakciji se kreće između 85 i 90% [11]. S obzirom na to da se glicerol može koristiti u druge svrhe, potrebno je izdvojiti ga, što se obično postiže gravitacionim taloženjem ili centrifugiranjem.

Kinetika reakcije transesterifikacije zavisi od vrste ulja, alkohola, katalizatora i molskog odnosa alkohola i ulja. Kiselo (sumporna kiselina, 1%) ili bazno (natrijum butoksid, 0,5 i 1%) katalizovana transesterifikacija sojinog ulja butanolom (molski odnos butanola i ulja 30:1) se odigrava kroz tri uzastopne reakcije pseudo-prvog reda [5]. Zbog relativno malog viška butanola, pri molskom odnosu butanola i ulja 6:1 u prisustvu natrijum butoksida, transesterifikacija sojinog ulja se verovatnije odigrava kroz uzastopne reakcije drugog reda, a ne pseudo-prvog reda [5]. Kinetika reakcije metanola i sojinog ulja pri molskom odnosu 6:1 u prisustvu natrijum metoksida (0,5%) se, međutim, bolje objašnjava kombinacijom uzastopne reakcije drugog reda i uporedne reakcije četvrtog reda [5].

Metanoliza palminog ulja u prisustvu kalijum hidroksida prati kinetiku reakcije drugog reda do 30-tog minuta reakcije. Konstante brzine reakcije hidrolize triglicerida, diglicerida i monoglicerida su u opsegu 0,018 – 0,191 (%(min)<sup>-1</sup>), a energije aktivacije iznose 61,6, 59,5 i 26,8 kJ/mol, respektivno [27]. Konstanta brzine alkalno katalizovane reakcije je mnogo veća u odnosu na kiselo katalizovanu reakciju [5].

Upotrebom heterogenih katalizatora, na primer, hidroksida, oksida i alkoksida zemno-alkalnih metala, može se pojednostaviti tehnološki proces, zbog lakoće njihovog izdvajanja iz reakcione smeše. Upotreba kalcijum oksida kao heterogenog katalizatora se preporučuje zbog niske cene i izuzetno male rastvorljivosti u metanolu [28]. Pravi katalizator reakcije je zapravo kalcijum metoksid koji nastaje na površini čestica kalcijum oksida, pa je neophodno da se one dobro suspenduju. Nedostatak heterogene katalize sa kalcijum oksidom je manja brzina reakcije u odnosu na reakciju katalizovanu natrijum hidroksidom. Upotrebom tetrahidrofurana kao rastvarača, reakcija se odigrava brzinom bliskom tipičnoj katalizi sa natrijum hidroksidom [28]. Metanoliza sojinog ulja izvedena je efikasno u prisustvu heterogenog baznog katalizatora Na/NaOH/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i rastvarača (*n*-heksan) [29]. Optimizacijom reakcionih uslova postignut je prinos biodizela od 94%, što je vrlo blizu prinosu u slučaju korišćenja natrijum hidroksida.

Biodizel dobrog kvaliteta se može dobiti transesterifikacijom korišćenih ulja. Upotreba ovakvih ulja je interesantna iz ekološkog i ekonomskog razloga, jer predstavlja pokušaj korišćenja sirovine koja je već jedanput upotrebljena. Visok prinos metilestara zadovoljavajućeg kvaliteta je postignut transesterifikacijom korišćenog ulja metanolom pri molskom odnosu metanola i ulja 6:1 i u prisustvu 1% kalijum hidroksida na temperaturi od 25°C [30].

## TRANSESTERIFIKACIJA KATALIZOVANA ENZIMIMA

Iako transesterifikacija katalizovana bazama daje visoke prinose metilestara za kratko vreme, ona ima i izvesne nedostatke, kao što su: preveliki zahtevi za energijom, teško izdvajanje glicerola i obaveza uklanjanja katalizatora iz proizvoda. Ovi problemi mogu biti zaobiđeni korišćenjem enzimskih reakcija sa lipazama (ekstra- i intraćelijskih) kao biokatalizatora. Poređenje bazno i enzimski katalizovane transesterifikacije izvršeno je u tabeli 1. Dobijanje biodizela enzimskim putem se još uvek ne primenjuje u industriji zbog visoke cene enzima. Da bi se enzimi reciklisali i koristili više puta, neophodno ih je imobilisati na odgovarajući način [31]. Imobilizacijom enzima povećava se njihova aktivnost i stabilnost [32].

Veliki broj različitih faktora, čije je dejstvo najčešće kombinovano, utiče na kinetiku transesterifikacije katalizovane enzima i prinos estara (biodizela). Najvažniji od njih su: vrsta i oblik lipaze, vrsta alkohola, prisustvo organskog rastvarača, sadržaj vode u uljima, molski odnos alkohola i ulja, temperatura i prisustvo glicerola. U tabeli 2 dat je pregled mikroorganizama – producenta lipaza, vrste supstrata (ulja) i alkohola, reakcionih uslova i prinosa estara.

### Vrsta lipaze, alkohola i prisustvo organskog rastvarača

U dosadašnjim istraživanjima korišćene su lipaze koje produkuju različiti mikroorganizmi. Lipaze, generalno, efikasno katalizuju reakcije ako su supstrati rastvorljivi jedan u drugom [42]. Alkoholi koji sadrže više od tri ugljenikova atoma rastvorljivi su u ulju, dok je rastvorljivost metanola i etanola u ulju veoma mala. Zato se metanoliza i etanoliza uglavnom odvijaju u prisustvu organskog rastvarača [31]. Stepenu konverzije triglicerida u odgovarajuće alkil este zavisi od kombinovanog uticaja vrste i oblika lipaze, vrste supstrata i prisustva organ-

skog rastvarača. Prinos estara se povećava imobilizacijom enzima [32, 39, 43].

Za transesterifikaciju ulja iz semena biljke *Jatropha* u odsustvu rastvarača korišćene su lipaze *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa* iz svinjske jetre, ali je značajniji prinos etilestara postignut samo sa lipazom *C. viscosum* imobilisanom na Celitu 545 [36]. U sistemu bez rastvarača, imobilisane lipaze *Candida antarctica* (Novozym 435) su dale visok prinos estara pri transesterifikaciji ulja iz semena pamuka sa primarnim i sekundarnim alkoholima kratkog ugljenikovog lanca [35]. Za transesterifikaciju korišćenog ulja biljnog porekla u sistemu bez rastvarača, korišćene su lipaze *Thermomyces lanuginosa* i *C. antarctica*, imobilisane na granulisanom silicijum-dioksidu (gran-*T.I.* i gran-*C.a.*, respectivno), *C. antarctica*, imobilisana na makroporoznoj akrilnoj smoli (SP-435), i *Pseudomonas cepacia*, imobilisana na filossilikatnom sol-gel matriksu (IM PS-30), a najbolji prinos metilestara i etilestara ostvarena je sa lipazom *P. cepacia* (IM PS-30) [39, 40, 44]. Lipaza *T. lanuginosa*, imobilisana na filossilikatnom sol-gel matriksu, efikasnija je u etanolizi zasićenih triglicerida i triglicerida sa većim sadržajem slobodnih masnih kiselina [44]. U transesterifikaciji sojinog ulja sa metanolom i etanolom najveći prinos alkilestara ostvaren je u prisustvu lipaze *P. cepacia* [43].

Imobilisane lipaze *Pseudomonas fluorescens*, *P. cepacia*, *Mucor javanicus*, *C. rugosa* i *Rhizopus niveus* korišćene su u transesterifikaciji suncokretovog ulja i trioleina, a najveći prinos estara je postignut sa lipazom *P. fluorescens* [31]. Za alkoholizu 1-butanolom ili 1-propanolom prisustvo organskih rastvarača nije potrebno. Enzimski aktivnost imobilisanih lipaza *P. fluorescens* pri metanolizi suncokretovog ulja i trioleina je bila najveća u prisustvu rastvarača 1,4-dioksana, a ekstremno mala u slučaju benzena, hloroforma i tetrahidrofurana [31]. Kori-

Tabela 1. Poređenje transesterifikacije katalizovane bazama i enzimima [6]

Table 1. Comparison of alkali- and enzyme-catalyzed transesterification processes [6]

	Bazno katalizovana reakcija Alkali-catalyzed transesterification	Enzimski katalizovana reakcija Enzyme-catalyzed transesterification
Temperatura reakcije Reaction temperature	60–70°C	3 °C                      0–50
Slobodne masne kiseline u sirovinama Free acids in crude materials	Proizvodi saponifikacije Products of saponification	Metilestri Methyl esters
Voda u sirovinama Water in crude materials	Ometa reakciju Affects negatively the reaction	Zavisi od vrste i oblika lipaze i prisustva rastvarača Dependent on the type and form of lipase and the presence of organic solvent
Prinos metilestara Yield of methyl esters	Normalan Normal	Viši Higher
Izdvajanje glicerola Glycerol separation	Teško Hard	Lako Easy
Prečišćavanje proizvoda Purification of products	Višestruko ispiranje Washing	Nepotrebno Not necessary
Cena katalizatora Cost of catalyst	Niska Low	Relativno visoka Relatively high

Tabela 2. Pregled uslova reakcija enzimske transesterifikacije sa lipazama različitog porekla  
Table 2. A review of the reaction conditions for enzyme-catalyzed transesterification

Supstrat Substrate	Alkohol Alcohol	Enzim Enzyme	Prinos Yield	Rastvarač Solvent	Uslovi reakcije/Reaction conditions				Refer- ence
					t, °C	Ulje:alkohol Oil:alcohol	Sadržaj vode (% u odnosu na masu ulja) Water (% with respect to the mass of oil)	Količina enzima (% u odnosu na masu ulja) Enzyme (% with respect to the mass of oil)	
Suncokretovo ulje Sunflower oil	Metanol Methanol	<i>R. miehei</i> (Lipozyme RM, IM) <i>T. lanuginosa</i> (Lipozyme TL, IM) <i>P. fluorescens</i> (Amano AK)	96	Heksan Hexane	40	1:3	-	10	[32]
			73		50	1:3			
			72		-	1:4,5			
Sojino ulje Soybean oil	Metanol Methanol	<i>T. lanuginosa</i> (Lipozyme TL, IM)	92	Ne None	50 30	1:4 1:1 (u tri stupnja/ three stages)	-	30	[33]
Sojino ulje Soybean oil	Metanol Methanol	<i>R. oryzae</i>	80-90	Ne None	35	1:1 (u tri stupnja/ three stages)	4-30	3 <sup>b</sup>	[34]
Pamukovo ulje Cottonseed oil	Metanol Methanol	<i>C. antarctica</i> (Novozym 435)	92	Ne None	50	1:4	-	30	[35]
Jatropha ulje Jatropha oil	Etanol Ethanol	<i>C. viscosum</i>	89	Ne None	40	1:4	0,5-1 <sup>a</sup>	15	[36]
Palmino ulje Palm oil	Metanol/Methanol Etanol/Ethanol	<i>P. cepacia</i> (lipase PS-30)	15 72	Ne None	40	1:4	-	10	[37]
Loj, sojino ulje i ulje iz uljane repice Tallow, soybean oil and rapeseed oil	Primarni alkoholi Primary alcohols Sekundarni alkoholi Secondary alcohols Metanol/Methanol Etanol/Ethanol	<i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60) <i>C. antarctica</i> (SP435) <i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60) <i>M. miehei</i> (Lipozyme IM60)	95-98	Heksan Hexane	45	1:3	-	10	[38]
			61-84						
			19 65						
Korišćeno ulje Waste cooking oil	Etanol Ethanol	<i>P. cepacia</i> (IM PS-30)	95	Ne None	50	1:4	-	10	[39]
Korišćeno ulje Waste cooking oil	Metanol/Methanol Etanol/Ethanol	<i>P. cepacia</i> (IM PS-30)	98 88	Ne None	40	1:4	do 3	10	[40]
Otpadno ulje Waste oil	Metanol Methanol	<i>R. oryzae</i>	55	Ne None	35	1:4	75	67 <sup>b</sup>	[41]

<sup>a</sup> - %w/v

<sup>b</sup> - IU/g

šćenjem imobilisanih komercijalnih lipaza *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM; nosač: jonoizmenjivačka smola), *T. lanuginosa* (Lipozyme TL; nosač: silika gel) i *P. fluorescens* (Amano AK; nosač: polipropilen) za transesterifikaciju suncokretovog ulja metanolom postignuti su visoki stepeni konverzije u prisustvu nepolarnih rastvarača, naročito *n*-heksana, a mali u prisustvu polarnog rastvarača acetona, verovatno zbog promene strukture enzima [32]. U slučaju upotrebe *n*-heksana palmino ulje je najbolji supstrat za lipazu *T. lanuginosa*, dok je lipaza *P. fluorescens* efikasnija u konverziji ulja iz semena pamuka u metilestre. Pri transesterifikaciji pamukovog ulja katalizovane lipazom *T. lanuginosa* u odsustvu rastvarača, prinos estara nižih alkohola je mali, dok lipaze *P. fluorescens* i *R. miehei* ispoljavaju veću katalitičku aktivnost [45]. U odsustvu rastvarača, prinos estara je relativno visok pri transesterifikaciji suncokretovog ulja lipazom *P. fluorescens* pri upotrebi etanola i 1-butanol, a vrlo mali pri upotrebi metanola (3%), s tim što se prinos metilestara višestruko uvećava u prisustvu petrol-etra (79%) [46].

Generalno, efikasnost enzimski katalizovane transesterifikacije triglicerida sa etanolom je veća nego sa metanolom, nezavisno od toga da li je organski rastvarač prisutan u reakcionoj smeši ili ne [6]. U slučaju tran-

sesterifikacije palminog ulja u alkilestre korišćenjem lipaze *P. cepacia* veći stepen konverzije ostvaruje se etanolom (72%) u odnosu na metanol (15%) [37]. Lipaze *Mucor miehei* su najefikasnije za konverziju triglicerida u estre sa primarnim alkoholima, a lipaze *C. antarctica* za transesterifikaciju sa sekundarnim alkoholima [38]. Maksimalni stepen konverzije je postignut sa primarnim alkoholima u prisustvu *n*-heksana (veći od 94%), dok je u odsustvu rastvarača prinos znatno manji (na primer, za metanol: 19,4%).

Negativan uticaj prisustva organskog rastvarača uočen je pri transesterifikaciji korišćenog ulja biljnog porekla. Prinos etilestara pri transesterifikaciji imobilisanom lipazom *P. cepacia* (IM PS-30) je manji u prisustvu *n*-heksana u odnosu na prinos ostvaren bez prisustva rastvarača [39]. Identičan uticaj *n*-heksana na prinos estara je zabeležen i pri korišćenju imobilisanih lipaza *T. lanuginosa* (gran T. l.) i *C. antarctica* (SP-435) [39].

Upotreba organskih rastvarača u enzimskoj transesterifikaciji je nepovoljna sa aspekta višestrukog korišćenja enzima. Dug kontakt sa organskim rastvaračem ima za posledicu drastično smanjenje aktivnosti enzima, tako da se lipaze nakon prvog ciklusa korišćenja ne mogu dalje koristiti [42]. U komercijalnoj proizvodnji biodizela nije preporučljiva upotreba organskih rastvarača,

zbog neophodnosti njihovog izdvajanja iz proizvoda, čime se povećavaju troškovi proizvodnje.

### Sadržaj vode u reakcionoj smeši

Brzina enzimske reakcije u organskim rastvaračima zavisi od količine vode prisutne u sistemu. Lipaze imaju jedinstvenu osobinu da katalizuju reakciju na graničnoj površini između vodene i organske faze. Aktivacija enzima uključuje otkrivanje aktivnog centra u toku konformacijskih promena molekula koje se dešavaju na graničnoj površini ulje–voda. Generalno, aktivnost lipaze zavisi od raspoložive međufazne površine, koja se povećava sa povećanjem količine vode. S druge strane lipaze katalizuju reakciju hidrolize u vodenoj sredini, zbog čega višak vode stimuliše konkurentnu reakciju hidrolize. Optimalni sadržaj vode predstavlja kompromis između sprečavanja hidrolize i povećanja enzimske aktivnosti za reakciju transesterifikacije [43]. Ovo je zapaženo i kod transesterifikacije jednostavnijeg estera nego što su trigliceridi. Optimalna vrednost aktivnosti vode pri kojoj je katalitička aktivnost enzima maksimalna zavisi i od vrste i oblika enzima i količine supstrata. Za transesterifikaciju etil butirata u butil butirat u *n*-heksanu, katalizovanu lipazom *C. rugosa* optimalna vrednost aktivnosti vode se povećava (od 0,33 na 0,54) sa povećanjem koncentracije estera – supstrata (50–200 mM) [47]. Pri velikoj aktivnosti vode (0,96) brzina transesterifikacije je mnogo manja od povratne reakcije hidrolize estera – proizvoda [47]. Iz tih razloga preporučuje se izvođenje transesterifikacije u dve faze [47–49]: prva faza odigrava se pri visokim vrednostima aktivnosti vode, da bi se favorizovala reakcija hidrolize estera – supstrata, a u drugoj fazi aktivnost vode je na optimalnom nivou, kako bi se favorizovala sinteza estera – proizvoda. Kontrolom sadržaja vode u reakcionoj smeši aerisanjem povećan je prinos estera pri esterifikaciji kaprilne kiseline i *n*-butanola u cikloheksanu pomoću lipaza *C. rugosa* [50].

Transesterifikacija korišćenih ulja biljnog porekla je specifična zbog većeg sadržaja slobodnih masnih kiselina, čijom esterifikacijom se oslobađa voda, koja može pomeriti ravnotežu transesterifikacije u pravcu hidrolize estera – proizvoda. Za kontrolu aktivnosti vode u takvim sistemima mogu poslužiti molekulska sita. Prinos metilestara pri transesterifikaciji korišćenih ulja lipazom *P. cepacia* imobilisanom na filosilikatnom sol – gel matriksu povećava se sa 75 na 96% u prisustvu molekulskih sita u količini do 14% računato na masu ulja [40]. Prisustvo molekulskih sita ima neznatan uticaj na prinos metilestara ukoliko je lipaza imobilisana na nosaču koji adsorbuje vodu, na primer silicijum dioksid [40].

U slučaju enzimske transesterifikacije u odsustvu rastvarača poželjno je da se u reakcionu smešu unese suspenzija slobodnog enzima u vodi, a ne čist enzim [51]. Tako, slobodno suspendovana lipaza *P. cepacia* katalizuje metanolizu sojinog ulja u sistemu bez vode, dok lipaze *C. rugosa*, *P. fluorescens* i *Penicillium camemberti* ne ispoljavaju katalitičku aktivnost i zahtevaju pri-

sustvo vode u reakcionoj smeši da bi se izbegla inaktivacija enzima metanolom. Prinos estera zavisi od vrste lipaze i količine prisutne vode [51]. Optimalna količina vode u reakcionoj smeši zavisi od oblika enzima (imobilisan ili slobodno suspendovan). Za etanolizu *Jatropha* ulja, optimalni sadržaj vode je 0,5, odnosno 1% (w/v) u slučaju imobilisane, odnosno slobodne lipaze *C. viscosum* [36]. Najveći stepen konverzije (80 – 90%) sojinog ulja sa metanolom u prisustvu lipaze *Rhizopus oryzae* je postignut pri sadržaju vode u sirovinama u opsegu 4–30% [34]. Pri manjem sadržaju vode prinos estera je bio znatno manji, što se pripisalo ireverzibilnoj inaktivaciji lipaza kao posledica denaturacije enzima metanolom. Iz tog razloga je lipaza *R. oryzae* vrlo pogodna za transesterifikaciju otpadnih ulja, koja neizbežno sadrže izvesnu količinu vode. Tako, produkcija metilestara pri transesterifikaciji otpadnog sojinog ulja (ekstrahovanog iz otpada pri rafinaciji sirovog ulja) lipazom *R. oryzae* se povećava sa povećanjem sadržaja vode u reakcionoj smeši, a najveći stepen konverzije (17,5%) postiže se za 24 sata pri sadržaju vode od 75% (računato u odnosu na masu ulja) [41]. Niži sadržaj vode (4 do 30%) se preporučuje kao optimalan za transesterifikaciju rafiniranih ulja [34]. U slučaju ekstrahovanih, nerafiniranih ulja, koja, za razliku od rafiniranih ulja, imaju veliki viskozitet, prisustvo vode u većem procentu olakšava mešanje i povećava međufaznu površinu ulje–voda.

### Molski odnos alkohola i ulja

U reakciji transesterifikacije katalizovane imobilisanim lipazama reaktanti formiraju trofazni sistem (triglicerid/alkohol/nosač), a brzina reakcija je kontrolisana međufaznim prenosom mase. Da bi se smanjila difuziona ograničenja i povećala brzina reakcije potrebno je dodati alkohol u višku u odnosu na stehiometrijski potrebnu količinu [43]. Molski odnos alkohola i ulja ima veliki uticaj na stepen konverzije triglicerida u sistemima bez rastvarača. Najveći prinos metilestara (87,4%) pri transesterifikaciji pamukovog ulja imobilisanom lipazom *C. antarctica* (Novozym 435) je ostvaren pri molskom odnosu alkohola i ulja 4:1 [35]. Pri većem molskom odnosu (5:1 i 6:1) smanjuje se prinos estera zato što višak metanola narušava sloj vode oko enzima koji ga stabilizuje, čime se njegova aktivnost smanjuje [35]. Transesterifikacija suncokretovog ulja metanolom lipazama *R. miehei* i *T. lanuginosa* se uspešno odvija do molskog odnosa metanola i ulja 3:1, dok je u slučaju lipaze *P. fluorescens* optimalni odnos 4,5:1 [32]. Radi utvrđivanja optimalnog molskog odnosa alkohola i ulja, transesterifikacija korišćenog biljnog ulja iz restorana lipazom *P. cepacia* imobilisanom na filosilikatnom sol–gel matriksu (IM PS–30) je vođena pri različitom odnosu metanola ili etanola i ulja u opsegu 1:1 do 6:1, a najveći prinos estera je ostvaren pri molskom odnosu 4:1 [39]. Najveći prinos metilestara i etilestara u transesterifikaciji sojinog ulja katalizovanoj imobilisanom lipazom *P. cepacia* ostvaren je pri molskom odnosu alkohola i ulja 7,5:1 i 15,25:1, respektivno

[43]. Uticaj molskog odnosa metanola i sojinog ulja na prinos estara i aktivnost imobilisane lipaze *T. lanuginosus* (Lipozyme TL) je proučavan u šaržnim i ponovljenim (u odnosu na imobilizovani enzim) šaržnim uslovima. Pri šaržnom postupku najbolji prinos estara je ostvaren pri molskom odnosu 4:1. Optimalni molski odnos metanola i ulja u ponovljenom šaržnom postupku je 1:1, pri čemu lipaza zadržava relativno visoku aktivnost i nakon desetog ciklusa [33].

Sve napred spomenute alkoholize su izvedene u prisustvu viška metanola, nego što je to stehiometrijski potrebno. U kontaktu lipaza sa nerastvornim kapljicama metanola ili etanola, koje postoje u ulju, alkohol se adsorbuje na imobilisanom enzimu, blokira pristup triglicerida, zbog čega se smanjuje aktivnost enzima, pa čak i zaustavlja reakcija u kasnijoj fazi [42]. Ovaj problem se prevazilazi stupnjevitim dodavanjem metanola u toku reakcije, u skladu sa dinamikom njegove potrošnje. Metanoliza biljnih ulja imobilisanom lipazom *C. antarctica* izvedena je u šaržnim uslovima sa dvostepenim [52] i trostepenim [53] dodavanjem metanola (po 1/3 i 2/3, odnosno po 1/3 stehiometrijski potrebne količine). Nakon 50 ciklusa trostepene (100 dana) i 70 ciklusa dvostepene (105 dana) metanolize biljnog ulja smanjenje aktivnosti lipaze je bilo beznačajno. Enzimska transesterifikacija u sistemima bez rasvarača može biti poboljšana dodavanjem površinski aktivnih materija. Metanoliza korišćenog biljnog ulja iz restorana u prisustvu lipaze Lipozyme TL IM znatno je unapređena dodavanjem Tween-40 (1% u odnosu na masu ulja) u emulziju pre reakcije. Uloga površinski aktivnih materija je da stabilizuju enzim time što smanjuju koncentraciju metanola po površini enzima [54].

Po nekim autorima moguće je izvršiti regeneraciju aktivnosti imobilisane lipaze *C. antarctica* dezaktivirane metanolom, ispiranjem sa 2-butanolom i *tert*-butanolom. Do regeneracija enzimske aktivnosti dolazi usled rastvaranja metanola, adsorbovanog na imobilisanom enzimu. Dodavanjem *tert*-butanola u trenutku opadanja prinosa metilestara, konverzija sojinog ulja u kontinualnom postupku sa jednostepenim dodavanjem metanola (molski odnos 3:1) je održana iznad 70% u toku 70 dana [55].

U sistemu sa većim sadržajem vode moguće je izvoditi transesterifikaciju pri većem molskom odnosu metanola i ulja, jer voda sprečava inaktivaciju enzima [41]. Zbog inaktivacije lipaze metanolom, neki autori predlažu upotrebu metil acetata kao acil akceptora, što omogućava da se transesterifikacija sojinog ulja pomoću imobilisane lipaze *C. antarctica* (Novozym 435) može izvoditi i pri molskom odnosu 12:1 [56, 57]. Osim toga, ovaj acil akceptor daje isti prinos metilestra nezavisno od toga da li je sojino ulje sirovo ili rafinisano, što nije slučaj sa metanolom. Još jedna prednost metil acetata ogleda se u tome da enzim zadržava svoju aktivnost i nakon 100-tog ciklusa, dok je u slučaju korišćenja metanola broj ciklusa znatno manji [56].

## Temperatura reakcije

Značajan parametar enzimske transesterifikacije je temperatura. Optimalna temperatura za biohemijsku sintezu zavisi od vrste i oblika enzima i načina izvođenja procesa. U slučaju metanolize suncokretovog ulja lipazama *T. lanuginosa* i *R. miehei* optimalna temperatura je 50 i 40 °C, respektivno [32]. Temperatura od 60 °C je optimalna za produkciju propil oleata pomoću slobodno suspendovane lipaze *P. fluorescens*, dok je sa imobilisanom lipazom skoro isti prinos ostvaren na 50 i 60 °C [31]. Najveći prinos metilestara iz pamukovog ulja imobilisanom lipazom *C. antarctica* (Novozym 435) je ostvaren na temperaturi 50 °C [35]. Optimalna temperatura za etanolizu korišćenog ulja iz restorana slobodnom lipazom *P. cepacia* (PS-30) je 40 °C, dok je u slučaju imobilisane lipaze (IM PS-30) optimalna temperatura u opsegu od 40 do 70 °C [39]. U šaržnom postupku imobilisana lipaza *T. lanuginosa* ima visoku aktivnost na višim temperaturama (40 do 50 °C), dok je u ponovljenom šaržnom postupku optimalna temperatura 30 °C [33]. To znači da lipaze mogu podneti visoku temperaturu u kratkom vremenskom periodu.

## Uticaj glicerola

Na aktivnost enzima može uticati glicerol koji se izdvaja kao proizvod reakcije transesterifikacije. Ovaj uticaj se pripisuje adsorpciji molekula glicerola na nosač enzima, čime se smanjuje difuzija molekula supstrata prema enzimu. Da bi se smanjio ovaj negativan efekat, predložen je dvostepeni proces, koji se sastoji od reakcije transesterifikacije i ispiranja katalizatora, radi izdvajanja adsorbovanog glicerola [58]. Ovakav semikontinualan proces je pogodan i sa aspekta razdvajanja proizvoda transesterifikacije. Glicerol se može uklanjati iz reakcione smeše u toku transesterifikacije kada se ona izvodi u membranskom reaktoru [59]. Reakcija transesterifikacije se odigrava u šupljim vlaknima, a glicerol koji nastaje u toku reakcije prolazi kroz membranu i akumulira se u anularnom prostoru sa vodenom fazom.

## Kinetika enzimske transesterifikacije

Po mišljenju mnogih autora kinetika enzimske transesterifikacije u organskom rastvaraču se pokorava Ping Pong Bi Bi modelu sa kompetitivnom inhibicijom alkoholom [60, 61]. Opšta jednačina ovog modela je:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_{TG}}{[TG]} \left(1 + \frac{[A]}{K_i}\right) + \frac{K_A}{[A]}}$$

gde je:  $v_{\max}$  – maksimalna brzina reakcije,  $K_{TG}$  i  $K_A$  – Michaelisove konstante za triglicerid i alkohol,  $K_i$  – konstanta inhibicije alkoholom i  $[TG]$  i  $[A]$  – molarne koncentracije triglicerida i alkohola. Primenom ovog kinetičkog modela na transesterifikaciju suncokretovog ulja, bogatog oleinskom kiselinom, butanolom u prisustvu komercijalne, imobilisane lipaze *R. miehei* u *n*-hek-

sanu, potvrđeno je dobro slaganje sa eksperimentalnim rezultatima [61]. Najveća odstupanja eksperimentalnih podataka i modela se javljaju u oblasti malih koncentracija supstrata, gde je i verovatnoća eksperimentalnih grešaka najveća. Vrednosti kinetičkih parametara  $v_{max}$ ,  $K_{TG}$ ,  $K_A$  i  $K_I$  su  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $5,3 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $55 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  i  $13 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , respektivno.

### Mogućnosti višestruke upotrebe lipaza

Pored činjenice da su imobilisani enzimi aktivniji i stabilniji u odnosu na slobodno suspendovane, najveća prednost korišćenja imobilisanih enzima, s obzirom na njihovu cenu, jeste mogućnost njihove višestruke upotrebe. Imobilisani enzimi mogu se odvojiti dekantacijom ili filtracijom nakon završene reakcije. Pri ponovnom korišćenju enzima može doći do promene enzimske aktivnosti, o čemu treba voditi računa. Ispitivanja aktivnosti imobilisane lipaze *P. fluorescens* u metanolizi trioleina i suncokretovog ulja pokazuju da aktivnosti opada za 1/3 nakon prvog ciklusa, dok je od drugog do desetog ciklusa pad aktivnosti skoro neznan [31]. Kada je enzim korišćen po prvi put, određena količina enzima se desorbovala. U toku daljeg korišćenja enzima nije se mogla uočiti njegova desorpcija. Imobilisane lipaze *T. lanuginosa* i *R. miehei* su korišćene u toku osam ciklusa transesterifikacije suncokretovog ulja sa stupnjevitom dodavanjem metanola [32]. Lipaza *R. miehei* je zadržala veliki deo svoje aktivnosti (stepen konverzije se smanjio za manje od 10%) posle osmog ciklusa, dok aktivnost lipaze *T. lanuginosa* u drugom ciklusu iznosi 50% od njene početne aktivnosti. Smanjenje aktivnosti enzima pri njegovom ponovnom korišćenju je posledica inaktivacije enzima alkoholom i glicerolom. Lipaza *C. antarctica* je korišćena u 54 uzastopna ciklusa transesterifikacije ulja tune sa dvo- i trostepenim dodavanjem etanola [62]. U toku dvostepene etanolize stepen konverzije ostaje nepromenjen do 37-og ciklusa, a zatim naglo opada, dok se u trostepenoj reakciji ostvaruje isti stepen konverzije (oko 95%) do 54-og ciklusa. Nakon 50 ciklusa trostepene (100 dana) i 70 ciklusa dvostepene (105 dana) metanolize biljnog ulja održan je stepen konverzije veći od 95%, odnosno od 93% [52, 53]. Aktivnost lipaze *C. antarctica* (Novozym 435) u transesterifikaciji sojinog ulja

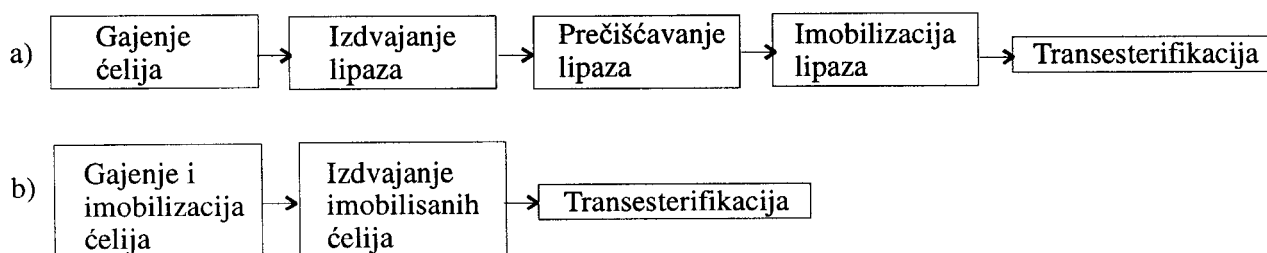
sa metanolom (trostepeno dodavanje metanola) se smanjuje za više od 30% nakon 4 ciklusa korišćenja enzima [56]. Upotrebom metil acetata kao acil akceptora nema primetnog gubitka aktivnosti lipaze i nakon 100-og ciklusa reakcije [56].

### Upotreba celih ćelija kao biokatalizatora transesterifikacije

Da bi se ekstraćelijske lipaze koristile kao biokatalizatori transesterifikacije, potrebno ih je izolovati, prečistiti i imobilisati, što nije tako jednostavno, naročito u industrijskim uslovima. Iz tih razloga je pogodna upotreba intraćelijskih lipaza, odnosno celih ćelija, koje se mogu spontano imobilisati na poroznim česticama u toku šaržne kultivacije. Na slici 1, radi poređenja, šematski su prikazani procesi transesterifikacije pomoću ekstraćelijskih i intraćelijskih lipaza.

Ban i sar. [63] su ispitali uticaj uslova kultivacije ćelija i sadržaja vode na metanolizu sa celim ćelijama *R. oryzae* imobilisanih na poroznim česticama poliuretanske pene. Dodatkom maslinovog ulja i oleinske kiseline u podlogu za kultivaciju ćelija aktivnost lipaza se značajno povećava. Metanoliza izvedena pri sadržaju vode u sirovinama od 10 do 20% i stupnjevitom dodavanju metanola daje prinos metilestra od 80 do 90%. Skoro isti prinos ostvaren je korišćenjem ekstraćelijskih lipaza [34]. Radi stabilizacije ćelija *R. oryzae* i njihovog korišćenja u dužem vremenskom periodu, neki autori [64] preporučuje tretiranje ćelija 0,1% rastvorom glutar aldehida. U toku šest ciklusa aktivnost lipaza ovih ćelija se neznatno smanjuje, a prinos estra je u opsegu od 83 do 70% u toku 72 časa. Stabilnost i aktivnost lipaze *R. oryzae* se povezuje sa udelom zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u ćelijskoj membrani, koji se može lako kontrolisati njihovim dodavanjem u hranljivu podlogu [65]. Enzimska aktivnost se povećava obogaćivanjem ćelijske membrane nezasićenom oleinskom kiselinom, dok se povećanje stabilnosti enzima postiže obogaćivanjem palmitinskom kiselinom. Iz tog razloga, preporučuje se tretiranje ćelija *R. oryzae* mešavinom oleinske i palmitinske kiseline pri udelu oleinske kiseline od 0,67 [65].

Najnovija istraživanja usmerena su ka primeni "genetički manipulisanih" celih ćelija kao biokatalizatora enzimske transesterifikacije [66,67]. Ćelije kvasca



Slika 1. Poređenje procesa transesterifikacije pomoću a) ekstraćelijskih i b) intraćelijskih lipaza [6]

Figure 1. Comparison of transesterification processes realized by using a) extracellular and b) intracellular lipases [6]



*Saccharomyces cerevisiae* modifikovane su ubacivanjem plazmida sa genom koji kodira sintezu lipaze u *R. oryzae*. S obzirom na to da je ćelijski zid kvasca relativno rigidan, radi povećanja njegove permeabilnosti ćelije kvasca su tretirane sušenjem na vazduhu temperature 42°C ili smrzavanjem (na -50°C) i topljenjem (na sobnoj temperaturi). Ovakve ćelije su korišćene u metanolizi sojinog ulja sa trostepenim dodavanjem metanola, u sistemu bez rastvarača [67]. Prinos metilestara iznosio je 71% u prisustvu ćelija sušenih na vazduhu, oko 50% u prisustvu smrzanjenih ćelija i manje od 1% u slučaju netretiranih ćelija, što znači da se barijera za difuziju supstrata i proizvoda značajno smanjuje tretiranjem (permeabilizacijom) ćelija.

## ZAKLJUČAK

Sadašnja naftna kriza u svetu ponovo je izbacila u prvi plan potrebu za korišćenjem obnovljivih sirovina kao izvora energije umesto konvencionalnih, neobnovljivih energenata (ugalj, nafta, prirodni gas). Posebna pažnja je posvećena mogućnostima dobijanja biodizela iz biljnih i životinjskih sirovina procesom transesterifikacije, zbog njegovih prednosti u odnosu na dizel gorivo D-2. Danas se industrijsko dobijanje biodizela zasniva na procesu transesterifikacije masti i ulja uz korišćenje baza ili kiselina kao katalizatora. Brojni problemi vezani za ovaj proces u pogledu utroška energije, izdvajanja proizvoda (MEMK i glicerol) i velike količine otpadne vode usmeravali su istraživanja u pravcu novih postupaka za dobijanje biodizela. Jedan od takvih postupaka je transesterifikacija katalizovana lipazama koja se još uvek ne primenjuje industrijski iz ekonomskih razloga uslovljenih visokom cenom i malom stabilnošću lipaza. Rezultati istraživanja sprovedenih poslednjih godina upućuju na zaključak da će vrlo brzo biti stvoreni uslovi za komercijalnu proizvodnju biodizela korišćenjem enzimskog procesa transesterifikacije. Tako je američka kompanija Archer Daniels Midland Company objavila da od 2002. godine koristi enzimski katalizovanu transesterifikaciju, u čijem razvoju je učestvovala i kompanija Novozymes, u industrijskoj proizvodnji margarina [68]. Japanska kompanija Nagase & Co., Ltd. nagoveštava skorbu primenu postupka za dobijanje biodizela iz korišćenih biljnih ulja iz restorana pomoću "inteligentnih" kvasaca [69]. Pored prednosti vezanih za samu reakciju transesterifikacije, primena enzima smanjuje i troškove izdvajanja proizvoda i stvara zanemarjive ekološke probleme.

Dalja istraživanja u cilju poboljšanja transesterifikacije katalizovane enzima usmerena su prema:

- razvoju novih reaktorskih sistema uz primenu imobilisanog biokatalizatora, koji omogućavaju višestruku i dugotrajnu upotrebu enzima;
- stupnjevito dodavanje metanola, da bi se sprečila dezaktivacija lipaza pri velikoj koncentraciji metanola;
- upotrebi lipaza tolerantnih prema organskom rastvaraču, da bi se povećala njihova stabilnost;

- upotrebi intraćelijskih lipaza, tj. celih mikrobnih ćelija producenata lipaza, da bi se pojednostavio proces prečišćavanja proizvoda;

- upotrebi genetički modifikovanih mikroorganizama sa poboljšanim proizvodnim osobinama.

## LITERATURA

- [1] A. Stefanović, D. Živković, J. Stamenković, V. Veljković, M. Lazić, Alternativa dizel goriva na bazi biljnih ulja – stanje i perspektive, 15 Naučno-stručni skup "Nauka i motorna vozila", 15-18. maj, Beograd (1995) str. 85-87
- [2] A. Srivastava, R. Prasad, Triglycerides – based diesel fuels, Renewable and Sustainable Energy Reviews, **4** (2000) 111-133
- [3] A. Orlović, D. Skala, Dizel gorivo iz biljnih ulja – mogućnosti proizvodnje, Hem. ind. **48** (11) (1994) 308-310
- [4] S.S. Šiler-Marinković, A.V. Tomašević, Lj.V. Mojović, S.D. Petrović, Optimizacija metanolize biljnih ulja. II: Uticaj sirovine, Hem. ind. **50** (7-8) (1996) 308-311
- [5] B. Freedman, R.O. Butterfield, E.H. Pryde, Transesterification kinetics of soybean oil, JAOCS **63** (1986) 1375-1380
- [6] H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, Biodiesel fuel production by transesterification of oils, J. Biosci. Bioeng. **92** (5) (2001) 405-416
- [7] R. Alcantara, J. Amores, L. Canoira, E. Fidalgo, M.J. Franco, A. Navarro, Catalytic production of biodiesel from soybean oil, used frying oil and tallow, Biomass and Bioenergy **18** (2000) 515-527
- [8] K.J. Harrington, D.V. Catherine, A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars, JAOCS **62** (1985) 1009-1013
- [9] G. Kildiran, S. Yücel, S.Ö. Turkey, In-situ alcoholysis of soybean oil, JAOCS **73** (1996) 225-228
- [10] G. Vicente, M. Martínez, J. Aracil, Integrated biodiesel production: a comparison of different homogenous catalysts system, Bioresource Technology **92** (2004) 297-305
- [11] S.S. Šiler-Marinković, A.V. Tomašević, Lj.V. Mojović, S.D. Petrović, Optimizacija metanolize biljnih ulja. I: Uticaj proizvodnih parametara, Hem. ind. **50** (7-8) (1996) 303-307
- [12] H. Noureddini, D. Harkey, V. Medikonduru, A continuous process for the conversion of vegetable oils into methyl esters of fatty acids, JAOCS **75** (1998) 1775-1783
- [13] C. Stavarche, M. Vinatoru, R. Nishimura, Y. Maeda, Conversion of vegetable oil to biodiesel using ultrasonic irradiation, Chem. Lett. **32** (8) (2003) 716-717
- [14] F. Ma, M.A. Hanna, Biodiesel production: a review, Bioresource Technology **70** (1999) 1-15
- [15] F. Ma, L.D. Clements, M.A. Hanna, The effects of catalyst, free fatty acids and water on transesterification of beef tallow, Trans. ASAE **41** (1998a) 1261-1264
- [16] G.B. Bradshaw, W.C. Meuly, Preparation of detergents, US Patent 2, 360-844 (1944)
- [17] M.J. Nye, P.H. Southwell, Esters from rapeseed oil as diesel fuel. In: Proc. Vegetable oil as diesel fuel seminar III., pp. 78-83, Peoria: Northern agricultural energy center (1983)
- [18] F.J. Sprules, D. Price, Production of fatty esters, US Patent 2, 366-494 (1950)
- [19] B. Freedman, E.H. Pryde, T.L. Mounts, Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils, JAOCS **61** (1984) 1638-1643
- [20] Y. Ali, Beef tallow as a biodiesel fuel, Ph. D., University of Nebraska, Lincoln (1950)

- [21] D. Zhang, Crystallization characteristics and fuel properties of tallow methyl esters. Master thesis, University of Nebraska, Lincoln (1994)
- [22] M.K. Smith, Process of producing esters, US Patent 2, 444-486 (1949)
- [23] F. Ma, L.D. Clements, M.A. Hanna, Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow, *Ing. Eng. Chem. Res.* **37** (1998b) 3768-3771
- [24] F. Ma, L.D. Clements, M.A. Hanna, The effect of mixing on transesterification of beef tallow, *Bioresource Technology* **69** (1999) 289-293
- [25] C.L. Peterson, D.L. Reece, R. Cruz, J. Thompson, A comparison of ethyl and methyl esters of vegetable oil as diesel fuel substitute, *Liquid fuels from renewable resources, Proceedings of an alternative energy conference of ASAE*, pp. 99-110 (1992)
- [26] C. Stavarache, M. Vinatoru, R. Nishimura, Y. Maeda, Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy, *Ultrasonics Sonochemistry* **12** (5) (2005) 367-372
- [27] D. Darnoko, M. Cheryan, Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor, *JAOCs* **77** (2000) 1263-1267
- [28] S. Gryglewicz, Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts, *Bioresource Technology* **70** (1999) 249-253
- [29] H.-J. Kim, B.-S. Kang, M.-J. Kim, Y. M. Park, D.-K. Kim, J.-S. Lee, K.-Y. Lee, Transesterification of vegetable oil to biodiesel using heterogenous base catalyst, *Catalysis Today* **93-95** (2004) 315-320
- [30] A.V. Tomašević, S.S. Šiler-Marinković, Methanolysis of used frying oil, *Fuel Processing Technology* **81** (2003) 1-6
- [31] M. Iso, B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16** (2001) 53-58
- [32] M.M. Soumanou, U.T. Bornscheuer, Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology* **33** (2003) 97-103
- [33] W. Du, Y. Xu, D. Liu, Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **38** (2003) 103-106
- [34] M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, H. Fukuda, Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88** (6) (1999) 627-631
- [35] O. Köse, M. Tüter, H.A. Aksoy, Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium, *Bioresource Technology* **83** (2002) 125-129
- [36] S. Shah, S. Sharma, M.N. Gupta, Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil, *Energy and Fuels* **18** (2004) 154-159
- [37] R. Abigor, P. Uadia, T. Foglia, M. Haas, K. Jones, E. Okpefa, J. Obibuzor, M. Bafor, Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils, *Biochem. Soc. Trans.* **28** (2000) 979-981
- [38] L.A. Nelson, A. Foglia, W.N. Marmer, Lipase-catalyzed production of biodiesel, *JAOCs* **73** (1996) 1191-1195
- [39] A.-F. Hsu, K.C. Jones, T.A. Foglia, W.N. Marmer, Optimization of alkyl ester production from grease using a phyllosilicate sol-gel immobilized lipase, *Biotechnology Letters* **25** (2003) 1713-1716
- [40] A.-F. Hsu, K.C. Jones, T.A. Foglia, W.N. Marmer, Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel, *Biotechnol. Appl. Biochem* **36** (2002) 181-186
- [41] A.V. Lara Pizarro, E.Y. Park, Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth, *Process Biochemistry* **38** (2003) 1077-1082
- [42] Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara, Y. Tominaga, Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reactor to oil processing, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **17** (2002) 133-142
- [43] H. Noureddini, X. Gao, R.S. Philkana, Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresource Technology* **96** (2005) 769-777
- [44] A.-F. Hsu, K.C. Jones, T.A. Foglia, W.N. Marmer, Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix, *Biotechnology Letters* **26** (2004) 917-921
- [45] M.M. Soumanou, U.T. Bornscheuer, Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105** (2003) 656-660
- [46] M. Mittelbach, Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil, *JAOCs* **67** (1990) 168-170
- [47] G.V. Chowdary, S.G. Prapulla, The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification, *Process Biochemistry* **38** (2002) 393-397
- [48] Z. Ujang, A.M. Vaidya, Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification, *Appl. Microbiol. Biotechnol* **50** (1998) 318-322
- [49] I. Svensson, E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications, *Biotechnology and Bioengineering* **44** (1994) 549-556
- [50] J.C. Jeong, S.B. Lee, Enzymatic esterification reaction in organic media with continuous water stripping: effect of water content on reactor performance and enzyme agglomeration, *Biotechnology Techniques* **11** (1997) 853-858
- [51] M. Kaieda, T. Samukawa, A. Kondo, H. Fukuda, Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91** (1) (2001) 12-15
- [52] Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase, *JAOCs* **77** (2000) 355-360
- [53] Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tominaga, Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *JAOCs* **76** (1999) 789-793
- [54] H. Wu, M.H. Zong, W.-Y. Lou, Y.-Y. Zhang, J. He, R. Xu, Improving lipase catalyzed transesterification of waste oil for biodiesel production in a solvent-free system with adding surfactant, The 227th ACS National Meeting, March 28-April 1, Anaheim, CA (2004)
- [55] J.-W. Chen, W.-T. Wu, Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95** (5) (2003) 466-469
- [56] W. Du, Y. Xu, D. Liu, J. Zeng, Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30** (2004) 125-129
- [57] Y. Xu, W. Du, D. Liu, J. Zeng, A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium, *Biotechnology Letters* **25** (2003) 1239-1241

- [58] V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production, *Enzyme and Microbial Technology* **25** (1999) 194–200
- [59] K. Belafi-Bako, F. Kovacs, L. Gubicza, J. Hancsok, Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system, *Biocatalysis and Biotransformation* **20** (6) (2002) 437–439
- [60] W. Chulalaksananukul, J-S. Condoret, P. Delorme, R.M. Willemot, Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane, *FEBS Lett.* **276** (1990) 181–184
- [61] V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology* **30** (2002) 90–94
- [62] Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88** (1999) 622–626
- [63] K. Ban, M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo, H. Fukuda, Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochemical Engineering Journal* **8** (2001) 39–43
- [64] K. Ban, S. Hama, K. Nishizuka, M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo, H. Noda, H. Fukuda, Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **17** (2002) 157–165
- [65] S. Hama, H. Yamaji, M. Kaieda, M. Oda, A. Kondo, H. Fukuda, Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production, *Biochemical Engineering Journal* **21** (2004) 155–160
- [66] M. Washida, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (2001) 681–686
- [67] T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Kaieda, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57** (2001) 515–520
- [68] Anonymus, ADM chooses a trouble-free process for trans-free fats, *Oil Mill Gazetteer* **109** (2004) 2–5
- [69] [http://nagase.co.jp/iso/english/05\\_technology.html](http://nagase.co.jp/iso/english/05_technology.html) (11.12.2004.)

## SUMMARY

### BIODIESEL PRODUCTION BY ENZYME-CATALYZED TRANSESTERIFICATION

(Review paper)

Olivera S. Stamenković<sup>1</sup>, Miodrag L. Lazić<sup>1</sup>, Vlada B. Veljković<sup>1</sup>, Dejan U. Skala<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Technology, University of Niš, 16000 Leskovac, Bulevar oslobođenja 124

<sup>2</sup>Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Karnegijeva 4  
State Union of Serbia and Montenegro

The principles and kinetics of biodiesel production from vegetable oils using lipase-catalyzed transesterification are reviewed. The most important operating factors affecting the reaction and the yield of alkyl esters, such as: the type and form of lipase, the type of alcohol, the presence of organic solvents, the content of water in the oil, temperature and the presence of glycerol are discussed. In order to estimate the prospects of lipase-catalyzed transesterification for industrial application, the factors which influence the kinetics of chemically-catalysed transesterification are also considered. The advantages of lipase-catalyzed transesterification, compared to the chemically-catalysed reaction, are pointed out. The cost of down-processing and ecological problems are significantly reduced by applying lipases. It was also emphasized that lipase-catalysed transesterification should be greatly improved in order to make it commercially applicable. The further optimization of lipase-catalyzed transesterification should include studies on the development of new reactor systems with immobilized biocatalysts and the addition of alcohol in several portions, and the use of extracellular lipases tolerant to organic solvents, intracellular lipases (i.e. whole microbial cells) and genetically-modified microorganisms ("intelligent" yeasts).

Key words: Biodiesel • Alkyl esters of fatty acids • Vegetable oils • Transesterification • Alcoholysis • Lipase • "Intelligent" yeasts •

Ključne reči: Biodizel • Alkil estri masnih kiselina • Biljna ulja • Transesterifikacija • Alkoholiza • Lipaza • "Inteligentni" kvasci •